Heterogenität des Glutaminstoffwechsels in der Rattenleber

Untersuchungen in situ und in kultivierten periportalen und perivenösen Hepatozyten unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisation der Glutaminsynthetase und der hormonellen Regulation des Aminosäuretransports

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Jörg Burger
aus Stuttgart

1987

Heterogenität des Glutaminstoffwechsels in der Rattenleber

Untersuchungen in situ und in kultivierten periportalen und perivenösen Hepatozyten unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisation der Glutaminsynthetase und der hormonellen Regulation des Aminosäuretransports

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Jörg Burger
aus Stuttgart

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	24. August 1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Mecke
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Bohley

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen am Lehrstuhl II unter der Anleitung von Prof. Dr. Dieter Mecke und Dr. Rolf Gebhardt angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dieter Mecke danke ich für die großzügige Förderung und sein stetes Interesse bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Rolf Gebhardt möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung, die durch viele wertvolle Anregungen und seine selbstverständliche Bereitschaft zur Beratung und Diskussion anstehender Probleme gekennzeichnet war, besonders danken.

Herrn Prof. Dr. R. Charles und seinen Mitarbeitern in Amsterdam danke ich für ihre Zusammenarbeit, die zu vielen gemeinsamen Ergebnissen führte.
Herrn Dr. H. Robenek in Münster danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.
Herrn Prof. Dr. Berg und seinen Mitarbeitern danke ich für die Einführung in die Western-Blottechnik.
Herrn Prof. Dr. Ch. Pfeiffer und Herrn Prof. Dr. J. Kleesen und ihren Mitarbeiterinnen, sowie Frau Dr. H. Schmidt danke ich für die Unterstützung bei den histochemischen Arbeiten.

Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. P. Bohley für sein Interesse und seine ständige Bereitschaft bei der Lösung von Problemen mitzuwirken.

Wertvolle Hinweise und unzählige Diskussionsbeiträge verdanke ich auch meinen Kollegen Hans G. Heini, Mathias Locher und Bernhard Ugele.

Ines Hoffmann möchte ich für die ausdauernde und freundschaftliche Unterstützung bei der Herstellung der monoklonalen Antikörper, Claus Mayer für die tatkräftige Hilfe bei den Experimenten zum Aminosäuretransport und Walter Pfefferle für die Mitwirkung bei der Reinigung der Glutaminsynthetase besonders danken.

Für das angenehme Arbeitsklima und viele Hilfeleistungen danke ich meinen weiteren Laborkolleginnen und -kollegen Andrea Schneck, Meta Landesvatter, Ingeborg Schäfer, Inge Neuber, Claudia Hennecke, Helga Fitzke, Klaus Valentin und Wolfgang Schulz. Auch allen nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen gilt mein herzlicher Dank.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Heterogenität des Leberparenchyms	1
1.2	Interzelluläre Kompartimentierung des Ammoniak- und Glutaminstoffwechsel	4
1.3	Aminosäuretransport in Hepatozyten	10
1.4	Methoden zur Untersuchung und Trennung von Leberparenchymzellpopulationen	17
1.5	Ziel der Arbeit	26
2.	Versuchstiere, Materialien und Methoden	28
2.1	Versuchstiere	28
2.2	Geräte	28
2.3	Verbrauchsmittel	29
2.3.1	Materialien	29
2.3.2	Fertigmedien, Chemikalien, Enzyme, Hormone	31
2.4	Lösungen und Medien	33
2.4.1	Lösungen für die Hepatozytenisolierungen	33
2.4.2	Medien für die Kultivierung von Myelomzellen und von Hybridomzellen	34
2.4.3	Lösungen für die Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	34
2.4.4	Lösungen für immunhistochemische Nachweis-reaktionen	35
2.5	Antikörper	36
2.6	Experimentelle Leberschädigung	37
2.7	Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten	37
2.8	Isolierung von Hepatozytensubpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation	39
2.8.1	Herstellung der Dichtegradienten	39
2.8.2	Gleichgewichts-Dichtegradienten-zentrifugation	40
2.9	Isolierung von Hepatozyten mit der Digitonin/Kollagenase-Methode	40

2.10	Isolierung von Zytoplasmamembranen	42
2.11	Reinigung der Glutaminsynthetase aus Rattenleber	43
2.12	Analytische Methoden	48
2.12.1	Aufarbeitung von Zellkulturen, Herstellen von Homogenaten	48
2.12.2	Enzymaktivitätsbestimmungen	49
2.12.2.1	Bestimmung der Glutaminsynthetase	49
2.12.2.1.1	Direkter radioaktiver Test	49
2.12.2.1.2	Direkter chemischer Test (Glutamylhydroxamat-test)	49
2.12.2.1.3	Indirekter chemischer Test (Glutamyltrans-ferasetest)	49
2.12.2.2	Bestimmung der 5'-Nukleotidase	50
2.12.2.3	Bestimmung der Pyruvatkinase	50
2.12.2.4	Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	50
2.12.3	Proteinbestimmungen	51
2.12.4	Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	51
2.12.5	Western-Blot-Technik	52
2.12.6	Immuntitrationen	53
2.12.6.1	Präzipitationstest mit Staphylococcus aureus	53
2.12.6.2	ELISA	54
2.12.6.2.1	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Glutaminsynthetase und Antigenen aus isolierten Membranfraktionen	54
2.12.6.2.2	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Zell-assoziierte Antigene	55
2.13	Aminosäuretransportmessungen	56
2.14	Immunhistochemische Verfahren	57
2.13.1	Fixierung und Kontrollfärbung	57
2.14.2	Immunhistochemische Färbungen	59
2.14.3	Einbettung der gefärbten Präparate	60
2.14.4	Elektronenmikroskopie (Immunogoldfärbung)	60
2.15	Antikörper	61
2.15.1	Polyklonale Antiseren	61

2.15.1.1	Antiserum gegen Glutaminsynthetase	61
2.15.1.1.1	Immunisierung	61
2.15.1.1.2	Serumgewinnung	62
2.14.1.1.3	Affinitätsadsorption zur Reinigung des Antiserums	62
2.15.1.2	Antiserum gegen Zytoplasmamembranen	63
2.15.2	Monoklonale Antikörper	64
3.	Ergebnisse	67
3.1	Antiserum gegen Glutaminsynthetase aus Rattenleber	67
3.1.1	Reinigung der Glutaminsynthetase	67
3.1.2	Herstellung und Charakterisierung des Antiserums	71
3.1.2.1	Immunisierung und Serumgewinnung	71
3.1.2.2	Charakterisierung und Reinigung des Antiserums	72
3.2	Heterogenität im normalen Leberparenchym	75
3.2.1	Lokalisierung von Glutaminsynthetase	75
3.3	Heterogenität von Hepatozyten in der Primärkultur	77
3.3.1	Immunzytochemische Anfärbung von Glutaminsynthetase	77
3.4	Trennung von perivenösen und periportalen Hepatozyten	78
3.4.1	Auftrennung von Hepatozyten mittels Dichtegradienten	79
3.4.2	Experimentelle Schädigung des Leberparenchyms	84
3.4.2.1	Schädigung mit Allylformiat	85
3.4.2.2	Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff	89
3.4.2.2.1	Kultivierung von Hepatozyten aus Lebern von mit CCl_4 vorbehandelten Ratten	89
3.4.3	Digitonin/Kollagenase-Methode	96
3.4.3.1	Charakterisierung der Zellpopulationen	96

UNIV. LUDWIGS

3.4.3.2	Co-Lokalisierung von Glutaminsynthetase und Carbamoylphosphat-Synthetase in isolierten Zellen	101
3.4.3.3	Heterogenität des Aminosäuretransports	104
3.5	Heterogenität von Hepatozytenantigenen	115
3.5.1	Membranassoziierte Antigene	115
3.5.2	Markierung periportaler und perivenöser Hepatozyten mit monoklonalen Antikörpern	122
3.5.2.1	Immunhistochemische Markierung im normalen Leberparenchym	122
3.5.2.2	Immunzytochemische Charakterisierung von kultivierten Hepatozyten mit dem monoklonalen Antikörper BG8-B1	126
4.	Diskussion	128
4.1	Heterogenität des Leberparenchyms in situ	128
4.2	Hepatozytensubpopulationen als experimentelles Modellsystem zur Untersuchung der Heterogenität des Leberparenchyms	130
4.3	Charakterisierung von Hepatozytensubpopulationen hinsichtlich ihrer acinären Herkunft	131
4.4	Glutaminsynthetase als perivenöses Markerenzym in vivo und in vitro	132
4.5	Trennung periportaler und perivenöser Hepatozyten	134
4.5.1	Dichtegradienten-Zentrifugation als ein geeignetes Mittel zur Gewinnung von Hepatozyten unterschiedlicher acinärer Herkunft?	134
4.5.2	Isolierung von Hepatozyten aus verschiedenen Bereichen des Acinus nach selektiver zonaler Schädigung mit Leber-toxischen Substanzen	138
4.6	Heterogene Verteilung des Aminosäuretransports	144

4.7	Physiologische Bedeutung der Heterogenität des Aminosäuretransports im Stoffwechsel von Glutamin und Glutamat	148
4.8	Immunologische Ansätze zur Identifizierung und Untersuchung von heterogen verteilten Antigenen	153
5.	Literaturverzeichnis	157
6.	Zusammenfassung	168
	Liste der Abkürzungen	172

1. Einleitung

1.1 Heterogenität des Leberparenchyms

Das normale Lebergewebe setzt sich aus parenchymalen (Hepatozyten) und nicht-parenchymalen Zellen zusammen. Der Anteil der parenchymalen Zellen am Gesamtvolumen beträgt 80%. Die Hepatozyten sind allgemein größer als die nicht-parenchymalen Zellen und machen 60% der Gesamtzellzahl aus. (26). Trotz einer großen Ähnlichkeit der Hepatozyten im Lichtmikroskop sind Unterschiede in der Ultrastruktur und in der Enzymausstattung der Zellen vorhanden. Auf diese Unterschiede wurde zuerst von Novikoff (138) aufmerksam gemacht. Eine Vielfalt von histochemischen und enzymatischen Daten weist auf eine metabolische Organisation des Acinus hin. Die meisten Daten, die im Rahmen dieser Fragestellungen ausgewertet wurden, wurden in Tierversuchen mit Ratten erhalten. Eine ausführliche Übersicht über frühere Befunde findet sich bei Rappaport (149).

Bisher bestehen jedoch immer noch kontroverse Auffassungen über die Definition einer einheitlichen strukturellen Grundeinheit, die parenchymale und nicht-parenchymale Zellen funktionell verbindet. Auf Grund von lichtmikroskopischen Untersuchungen an Schnitten von Schweineleber wurde von Kiernan 1833 ein Konzept vorgeschlagen, das von statischen polygonalen Einheiten, sogenannten Leberläppchen ausgeht (101). Ein Leberläppchen wird als hexagonale Einheit des Leberparenchyms mit einer Zentralvene im Zentrum beschrieben. Jede Zentralvene sammelt Blutanteile von 3-4 oder mehr portalen Bereichen, die die Peripherie des Läppchens markieren (32).

Rappaport schlug 1954 basierend auf Beobachtungen der Mikrozirkulation und nach Beobachtung von pathologischen Läsionen in der Leber das Modell des Acinus als funktionelle Einheit des Leberparenchyms (150) vor. Diese Einheit läßt sich anschaulich am besten beerenförmig um eine zentrale Achse orientiert darstellen, die aus terminalen Verzweigungen der Portalvene, hepatischen Arteriolen, Gallengängen, Lymphgefässen und Nerven besteht, die zusammen aus einem kleinen dreizipfeligen Portalfeld mit präterminalen Gefäßen auswachsen. Von da aus fließt das ankommende Blut in die Sinusoide des periportalen Bereichs und wird nacheinander an etwa 20 Hepatozytenschichten vorbeigeführt, bevor es in die terminalen hepatischen Venolen entleert wird. Dieses aufeinanderfolgende Vorbeifließen des Bluts an den Hepatozyten schafft für die Zellen verschiedene Mikroumgebungen mit vermuteter unterschiedlicher arterieller Versorgung und unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrucken in der Umgebung, die zur Einteilung des Acinus in drei Zonen führten (150). Die Zellen der periportalen Zone 1 bilden die innere Schale direkt um die Achse herum, während die perivenösen Zellen der Zone 3 die äußere Schale mit den terminalen hepatischen Venen als Orientierungspunkten bilden. Zwischen diesen beiden Zonen liegt die intermediäre Zone 2, die keine äußeren Grenzen besitzt.

Obwohl die mehr traditionelle lobuläre Einteilung mit den Orientierungsmerkmalen "Zentralvene" und den Portalfeldern an den Ecken des Polygons von vielen Pathologen zur Beschreibung histologischer Befunde bevorzugt wird, findet das Acinusmodell mit seiner zutreffenderen Beschreibung der funktionellen Verhältnisse in der Leber inzwischen die Zustimmung der meisten Autoren. Durch das Acinusmodell konnten zum erstenmal die unterschiedlichen Enzymaktivitäten in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden. Dies führte zu einer Zuordnung von Stoffwechselwegen wie Glyko-

genabbau, Glykogensynthese, Gluconeogenese und oxidative Metabolisierung zur periportalen Zone 1 und von Stoffwechselwegen wie Fettbildung, Glykolyse und Fremdstoffmetabolismus zur Zone 3, die den perivenösen Bereich umfaßt (Übersicht bei 149).

Die zunehmende Zahl von Berichten über die heterogene Verteilung von Enzymaktivitäten der verschiedensten Stoffwechselwege (Übersicht bei 94,62) führte zur Aufstellung eines allgemeinen Modells der Stoffwechselregulation, "der metabolischen Zonierung", von Jungermann & Sasse (94) und Jungermann & Katz (92,91). Befunde, die diesem Modell zu Grunde liegen, kamen überwiegend aus der Untersuchung der Verteilung von Schlüsselenzymen des Glucosestoffwechsels und zeigen (Literaturverweise bei 92,91) eine bevorzugte Katalysierung von Stoffwechselwegen, die zur Glucoseabgabe führen, wie Gluconeogenese und Glykogenolyse, in Zone 1 und von Stoffwechselwegen, die für die Aufnahme und den Abbau von Glucose von Bedeutung sind, in Zone 3. Zu beachten ist, daß im Prinzip alle Hepatozyten die gleiche genetische Kapazität zur Expression dieser Stoffwechselwege besitzen und Unterschiede in der Aktivität in den einzelnen Zonen hauptsächlich quantitativer Natur sind. Für die heterogene Expression wurden hauptsächlich zonale Unterschiede der Signale, die diese Stoffwechselwege regulieren, verantwortlich gemacht. Dazu gehören unterschiedliche Sauerstoff- und Hormonkonzentrationen und Unterschiede in der Innervation der Zellen (92,91,90). Ein sehr wichtiger Gesichtspunkt, der gleichzeitig die wichtigste Evidenz in vivo für die funktionelle Bedeutung des Modells darstellt, ist die Dynamik der zonalen Heterogenität. Deutlich wird dies an der Verschiebung des Grades der Zonierung nach längerdauernden Änderungen der metabolischen Situation oder nach pathologischen Veränderungen. Befunde dazu wurden entweder aus Enzym- oder Metabolitverteilungen in vivo, nach Induktion der entsprechen-

den Stoffwechsellagen in Zellkulturen oder aus Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber erhalten (zur Übersicht 90). So vergrößert sich während einer längeren Fastenperiode die Glucose-bildende Zone durch Zunahme der Aktivität der gluconeogenetischen und glykogenolytischen Enzyme (164). Während der Regeneration nach partieller Hepatektomie kann sich der gluconeogene Bereich in den intermediären Bereich oder sogar in die perivenöse Zone hinein verschieben (15). Ebenso interessant sind die Verschiebungen während der peri- und postnatalen Entwicklung der Leber (96).

1.2 Interzelluläre Kompartimentierung des Ammoniak- und des Glutaminstoffwechsels

Die Leber ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung eines niedrigen nichttoxischen Ammoniakspiegels im Plasma. Hyperammonämie ist einer der Faktoren, die in der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie bei fortgeschrittener Leberschädigung ursächlich mitverantwortlich sind (56).

Irreversible Ammoniakbindung in der Leber erfolgt hauptsächlich über die Enzyme des Harnstoffzyklus, während die Ammoniakbindung über die Synthese von Glutamin durch die Wirkung von Glutaminasen in der Leber, in der Niere und im Darm als reversibel angesehen wird. Durch die Hydrolyse von Glutamin, das hauptsächlich aus dem Muskel stammt (36), im Darm (196) und in der Leber wird Ammoniak gebildet, der wiederum als Substrat für die hepatische Harnstoffsynthese (131) dienen kann. Die zugrunde liegenden Reaktionen wurden bereits in frühen Arbeiten von Krebs (115,116,114) beschrieben, der die eigenständige Rolle der Leber nicht nur in

Bezug auf die Harnstoffbildung, sondern auch im Glutaminstoffwechsel herausstrich.

Trotz vieler Untersuchungen zum besseren Verständnis des hepatischen Glutaminstoffwechsels (Literaturübersicht s. 73) blieb die funktionelle Bedeutung des Glutaminstoffwechsels in der Leber bis in die 80er Jahre weitgehend unklar. Abhängig von der Ernährungslage und den experimentellen Bedingungen fand man entweder eine leichte Nettoglutaminaufnahme oder -abgabe durch die Leber (83,154). Die Aufrechterhaltung dieser Balance wurde durch die komplexe und empfindliche Regulation der hepatischen Glutamin-metabolisierenden Enzyme über die portale Glutamin- und Ammoniakkonzentration, den pH-Wert und durch schwankende Hormonkonzentrationen erklärt, ohne daß diese Befunde in ein Gesamtkonzept eingebettet werden konnten (Übersicht s. 130).

Durch die Entdeckung eines "Leerlaufzyklus" von Häussinger und Siess (80) mit gleichzeitiger Glutaminaufnahme und -abgabe eröffnete sich eine neue Betrachtungsweise des Glutaminstoffwechsels. Maßgeblich dazu beigetragen haben die Untersuchungen zur interzellulären Kompartimentierung des Ammoniak- und Aminosäuremetabolismus. Die Daten über die bevorzugte Lokalisierung von Enzymen und Stoffwechselwegen, die in Zusammenhang mit dem Aminosäure- und Ammoniakstoffwechsel stehen, sind übersichtlich bei Jungermann (90) zusammengefaßt.

Die meisten dieser Enzymaktivitäten zeigen einen mehr oder weniger steilen Gradienten von der periportalen bis zur perivenösen Zone über den Acinus hinweg. Die nicht klar definierte Grenze zwischen der periportalen und perivenösen Zone darf allerdings nicht statisch angesehen werden, sondern sollte unter einem mehr dynamischen funktionellen Gesichtspunkt betrachtet werden. Dies zeigt sich auch in den starken Schwankungen der periportalen:perivenösen Verhältnisse vieler Enzymaktivitäten, die hauptsächlich in quanti-

tativen immunhistochemischen Untersuchungen oder nach Mikrodissektion bestimmt wurden (Übersicht bei 90).

Auf der Basis der vorhandenen Daten zur Enzymlokalisation wurde eine überwiegend periportal lokalisierte Verwertung der Aminosäuren angenommen. Da auch die Enzyme der Gluconeogenese vorwiegend in der periportalen Zone gefunden wurden, zeigt sich auch hier, daß funktionell zusammenhängende Stoffwechselwege in den gleichen Bereichen des Acinus lokalisiert sind (91).

Von besonderer Bedeutung für die Aufklärung des Zusammenwirkens der einzelnen Stoffwechselwege des Ammoniak- und Aminosäuremetabolismus waren die Untersuchungen, die zur Lokalisierung der Glutaminsynthetase geführt haben. Mit immunhistochemischen Methoden wurde von Gebhardt & Mecke (52) gezeigt, daß Glutaminsynthetase ausschließlich in einer kleinen Subpopulation von perivenösen Parenchymzellen, die die terminalen hepatischen Venolen umrunden, lokalisiert ist. Außerdem scheinen die mitochondriale Carbamoylphosphat-Synthetase (39), die Argininosuccinat-Synthetase (162) und die Ornithin-Transcarbamoylase (136) eine dazu komplementäre Lokalisierung im Acinus aufzuweisen. Die extreme Verteilung der Glutaminsynthetase weist einige von den anderen Enzymen deutlich verschiedene Charakteristika auf, die für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung waren, und deshalb im folgenden kurz beschrieben werden sollen.

So wird die heterogene Verteilung der Glutaminsynthetase bereits vor der Geburt beobachtet (38), während die Carbamoylphosphat -Synthetase in der foetalen Leber homogen verteilt ist und ihre heterogene Verteilung erst später in der Entwicklung erreicht (40). Bis jetzt wurden in vivo, sowohl in der normalen Leber als auch unter einer Vielzahl von pathologischen Verhältnissen, noch keine Bedingungen gefunden, unter denen sich die strenge Lokalisierung der

Glutaminsynthetase um die entleerenden Gefäße herum verändert (53). Auch nach Isolierung der Hepatozyten und Kultivierung wurde stets der gleiche Anteil an Glutaminsynthetase-haltigen Zellen gefunden wie in der intakten Leber (52).

Die erstaunliche Stabilität der Verteilung der Glutaminsynthetase, die im Gegensatz zu anderen Enzymen des Aminosäure-Stoffwechsels steht, ist daher wahrscheinlich auf Unterschiede im Phänotyp zwischen den Glutaminsynthetase-haltigen und den restlichen Hepatozyten im Acinus zurückzuführen (53). Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der verschiedenen Hepatozytenpopulationen stützen diese Hypothese (48).

Parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisierung der Glutaminsynthetase wurden von Häussinger et al. metabolische Studien mit antegrad und retrograd perfundierter Leber durchgeführt (72), die auf eine Trennung der Harnstoff- und Glutaminsynthese innerhalb des Leberparenchyms hinweisen und somit die Bedeutung der immunhistochemischen Befunde unterstreichen. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Enzyme des Harnstoffzyklus und die Harnstoffsynthese in der periportalen Zone höhere Aktivitäten aufweisen müssen (72). Mit der Entwicklung von Methoden zur Anreicherung von periportalen und perivenösen Zellen (147,126) in jüngster Zeit konnten direkte Messungen der Harnstoffsyntheseraten in den entsprechenden Zellpopulationen durchgeführt werden, die die früheren Ergebnisse, die auf der Messung von Enzymaktivitäten oder auf Untersuchungen am perfundierten Organ basierten, bestätigen (145). Die Harnstoffbildung benötigt stöchiometrische Mengen an Aspartat und Ammoniak. Ammoniak kann periportal aus endogenen Aminosäuren via Transaminierung mit nachgeschalteter Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion, die allerdings überwiegend perivenös lokalisiert ist, freigesetzt werden (77). Dennoch sollte auch in periportalen Bereichen noch genügend Aktivi-

tät zur entsprechenden Ammoniakbildung vorhanden sein. Der größte Beitrag zur Erzeugung von Ammoniumionen wird wahrscheinlich periportal durch die Hydrolyse von Glutamin mittels Phosphat-abhängiger Glutaminase geleistet. Erste Hinweise auf die Lokalisation dieses Enzyms wurden ebenfalls aus Perfusionsexperimenten von Häussinger (72) erhalten. Für die Bildung von Ammoniak aus Glutamin via Glutamin-Aminotransferase und -amidase wurden keine Hinweise auf eine heterogene Lokalisierung gefunden. Diese Aktivitäten spielen auch im Vergleich zur Glutaminasereaktion keine große Rolle (82).

Diese Untersuchungen zeigen weiterhin, daß ohne Zugabe von Ammoniak aus periportal neu gebildeten Ammoniumionen während antegrader Perfusion Glutamin synthetisiert wird, während diese bei Umkehr der Perfusionsrichtung ausgewaschen werden. Diese Befunde zur Lokalisierung der Ammoniakverwertung werden auch durch den hohen Km-Wert der Carbamoylphosphat-Synthetase I (132) und den niedrigen Km-Wert der Glutaminsynthetase (30) wahrscheinlich (79).

In Versuchen, in denen eine perivenöse Leberzellnekrose durch Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (139) herbeigeführt wurde, wurde ein fast vollständiger Verlust der Glutaminsynthese beobachtet (75). Auch immunhistochemisch konnte unter diesen Bedingungen das Enzymprotein nicht mehr nachgewiesen werden (52). Hingegen war die Harnstoffsynthese nach CCl_4-Schädigung praktisch nicht beeinträchtigt (75).

Der strengen und klaren interzellulären Verteilung vor allem der Glutaminsynthetase, die nicht mit der konventionellen periportalen und perivenösen Einteilung in Einklang gebracht werden kann, sondern als Subzone im perivenösen Areal angesehen werden muß, wurde von Gebhardt und Mecke durch eine detailliertere Beschreibung der Zonierung des Ammoniakstoffwechsels mit den Begriffen "afferentes Harnstoffsynthese-Kompartiment" und "efferentes Glutaminsyn-

these-Kompartiment" Rechnung getragen (53,54). Damit ergibt sich eine besondere Rolle für die Glutaminsynthese als Abfangreaktion für Ammoniumionen, die bei der Harnstoffsynthese entgehen bzw. für die Aufrechterhaltung der Stickstoffbilanz in Form eines unschädlichen Metaboliten gespeichert werden sollen (52,72). Dies wurde auch aus Untersuchungen deutlich, in denen die Glutaminsynthetase-Aktivität durch toxische Schädigung des perivenösen Areals mittels Tetrachlorkohlenstoff drastisch verringert wurde, wodurch die Aufnahme von Ammoniak durch die Leber stark vermindert wird und es zu einem Ausfall der Glutaminsynthese kommt (75,74).

Diese Befunde zur heterogenen Verteilung der Stoffwechselwege im Glutaminmetabolismus bildeten die Basis für die Formulierung des Konzepts eines "interzellulären Glutaminzyklus" (173,79,53,54):

Zusätzlich zum periportal anströmenden Ammoniak werden durch die Aktivität der Glutaminase Ammoniumionen für die Harnstoffsynthese zur Verfügung gestellt. Da Glutamin außer für die Bereitstellung von Ammoniumionen auch für weitere Biosyntheseschritte in der Leber benötigt wird (1), muß, da das afferente Kompartiment keine eigene Glutaminsynthese durchführen kann, alles zusätzlich benötigte Glutamin aufgenommen werden. Eine Nettoaufnahme von Glutamin kann nur durch eine entsprechende endogene Resynthese verhindert werden (53). Dieser Ausgleich des Abbaus wird durch die Synthese von Glutamin im "efferenten Glutaminsynthese-Kompartiment" unter weiterer Fixierung von Ammoniak gewährleistet.

1.3 Aminosäuretransport in Hepatozyten

Da die Leber die wichtigste Stelle für den Metabolismus von Aminosäuren im Organismus ist, muß die Untersuchung des Aminosäuretransports nicht nur im Hinblick auf den speziellen Stoffwechsel in der Leber, sondern auch im Hinblick auf die metabolische Homöostase des gesamten Organismus von großem Interesse sein.

Untersuchungen an perfundierter Rattenleber, isolierten Hepatozyten, Hepatozytenkulturen und isolierten Plamamembranvesikeln erbrachten die Unterscheidung und Charakterisierung einer großen Vielfalt von Transportsystemen in der Leber, die am Austausch von Aminosäuren zwischen dem extrazellulären Milieu und dem Zytoplasma beteiligt sind. Dies unterstreicht die zentrale Stellung der Leberparenchymzellen im Aminosäurestoffwechsel. Diese Transportsysteme wurden hauptsächlich durch ihre Abhängigkeit von bestimmten ionalen Verhältnissen, durch den Transport von für das System spezifischen Modellsubstraten (nicht metabolisierbare Aminosäureanaloga) und durch die Kompetition dieser Substrate mit dem Transport der natürlich vorkommenden Aminosäuren charakterisiert (ausführliche Übersichten bei 102,21,171). Im folgenden liegt der Schwerpunkt der Betrachtung bei zwei Systemen für neutrale Aminosäuren, System A und N. Ersteres ist ein wichtiges Modellsystem im Zusammenhang mit der Regulation der hepatischen Gluconeogenese, während letzteres deshalb von Bedeutung ist, da es bisher ausschließlich in Hepatozyten oder davon abgeleiteten Hepatomzellen gefunden wurde (171). Weiterhin wird auf ein System eingegangen, das für den Transport von Glutamat in seiner anionischen Form zuständig ist und im Hinblick auf die Regulation des interzellulären Glutaminzyklus von Bedeutung sein könnte (51,53).

System A als Transportsystem für neutrale Aminosäuren mit kurzen, nicht verzweigten Seitenketten wurde zusammen mit einem anderen Transportsystem für neutrale Aminosäuren, System L, auf das hier nicht weiter eingegangen werden soll, bereits in den 60er Jahren von Oxender & Christensen (140) in Ehrlich Aszites Zellen beschrieben. Aminosäuretransport via System A ist ein Natrium-abhängiger elektrogener Prozeß. Das System zeigt eine Sensitivität gegenüber der Erniedrigung des pH-Werts (140). Interessant ist außerdem eine Hemmung durch hohe intrazelluläre Konzentrationen an Aminosäuren (trans-Inhibition)(65). α-Aminoisobuttersäure als nicht metabolisierbares Analogon von Alanin wurde lange Zeit als Modellsubstrat für System A angesehen, kann jedoch in verschiedenen Zelltypen auch durch andere Systeme transportiert werden (104,5,170). Das N-methylierte Analogon α-Methylamino-Isobuttersäure wird von anderen Systemen kaum toleriert (23) und ist deshalb ein auf System A beschränktes Substrat. Damit kann auch der durch N-Methyl-AIB hemmbare Anteil des AIB-Transports als spezifisch für System A betrachtet werden.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß der Alanin-Transport geschwindigkeitsbestimmend für die Metabolisierung dieser Aminosäure ist (175,35,176). Damit kommt der Alanintransport als wichtige Regulationsstelle des hepatischen Alaninmetabolismus in Betracht.

Stellvertretend soll hier die Regulation in Abhängigkeit des Substratangebots und durch Hormone erwähnt werden. Beim Regulationstyp der "adaptiven Kontrolle" handelt es sich um einen Anstieg der Transportkapazität in Abwesenheit von extrazellulären Aminosäuren. Dieser Regulationstyp wurde zuerst an Herzzellen von Hühnerembryonen (43) und an Uteruszellen von Ratten (155) beobachtet. Im Lebergewebe wurde dieser Regulationstyp an isolierten Hepatozyten (120) und in

Primärkultur (99,104) beschrieben. Die Stimulation dürfte Resultat einer Neusynthese eines Glykoproteins der Plasmamembran sein (2,103). Auch der umgekehrte Prozeß, die Erniedrigung der zuvor adaptiv oder hormonell stimulierten Transportkapazität von System A durch Erhöhung der extrazellulären Aminosäurekonzentration , die als "Repression" bezeichnet wird, konnte in Hepatozytenkulturen nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der neueren Befunde zur adaptiven Kontrolle von System A wird von Kilberg et al. (103) gegeben.

Von der Vielzahl der Hormone, die System A stimulieren können (Übersicht bei 171), ist die Stimulierung durch Glucagon am besten charakterisiert (120,108,141,106). Eine der wichtigsten Funktionen von Glucagon in der Leber ist die Steigerung der hepatischen Glucosebildung während hypoglykämischer Phasen. Auf die Bedeutung der Glucagonregulation von System A wurde dadurch hingewiesen, daß einige der besten Substrate von System A gleichzeitig auch zu den effektivsten Substraten für die Gluconeogenese in isolierten Hepatozyten zählen (103). Damit kann während hypoglykämischer Phasen Glucagon nicht nur die Gluconeogenese induzieren, sondern könnte für die Hepatozyten durch die entsprechende Erhöhung des Transports von Aminosäurenvorstufen die Verfügbarkeit entsprechender Substrate verbessern (103). Auch durch Insulin kann die Aufnahme über System A gesteigert werden, allerdings ist diese Erhöhung der Transportkapazität in kultivierten Hepatozyten deutlich niedriger als mit Glucagon (44).

Über die Rolle der Glucocorticoide gibt es derzeit noch unterschiedliche Auffassungen. So wurde an der isoliert perfundierten Leber (20) und an frisch isolierten Hepatozyten (120,17) eine Steigerung des Transports via System A gefunden, die additiv zu Effekten anderer Hormone war (120). Demgegenüber wurde an kultivierten Hepatozyten entweder kein

(141) oder aber ein senkender Einfluß von Dexamethason (14) beobachtet. In beiden Fällen wurde eine permissive Wirkung auf die Induktion durch andere Hormone gefunden.

Glutamintransport durch die Plasmamembran von Hepatozyten erfolgt bevorzugt durch ein Natrium-abhängiges Transportsystem für neutrale Aminosäuren, das erstmals von Joseph et al. (89) an isolierten Hepatozyten gefunden wurde. Dieses System wurde bis heute nur in Zellen aus dem Lebergewebe (89,105) oder aus davon abstammenden Hepatoma- (188) und einigen Epithelzellinien (55) nachgewiesen. Dieses Transportsystem nimmt außerdem bevorzugt die Aminosäuren Asparagin und Histidin (105) auf und wurde deshalb als "System N" bezeichnet.

Von System A wurde System N unter anderem dadurch unterschieden, daß die Glutaminaufnahme durch N-methylalanin, einem Modellsubstrat für System A, nicht gehemmt werden konnte (105) und auch andere kinetische Eigenschaften aufwies (89). Als weitere Charakteristika für System N gelten die Tolerierung von Lithiumionen anstelle von Natriumionen und außer einer Sensitivität gegenüber niedrigen pH-Werten eine Anfälligkeit gegenüber N-Äthylmaleimid (105,55).

Auch für System N wurde in Hepatozyten, wie für System A, eine adaptive Kontrolle gezeigt, die das System in Abhängigkeit von vorhandenen Aminosäuren in einem reprimierten oder dereprimierten Zustand hält (105,66). Widersprüchliche Befunde wurden aus Untersuchungen an Hepatozytenkulturen berichtet, die unter vergleichbaren Bedingungen keine Erhöhung der Transportkapazität aufzeigten. Nur in Aminosäurearmen Kulturmedien wurde eine schwache Erhöhung der Transportkapazität gefunden (44). In entsprechenden in vivo Versuchen, nach Hungern der Tiere, war, im Gegensatz zu System A, keine Zunahme der Transportaktivität von System N zu beobachten (68).

Eine hormonelle Kontrolle des Systems N wurde in früheren Untersuchungen verneint (105,3). Allerdings wurden die entsprechenden Experimente nur über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden durchgeführt. Erste Hinweise auf eine hormonelle Regulation lieferten Experimente an Hepatozytenkulturen, in denen sich Veränderungen der Aminosäurekonzentrationen im Kulturmedium unter dem Einfluß verschiedener Hormone zeigten (107). Direkte Messungen der Transportkapazität von System N ergaben ein differenzierteres Bild der hormonellen Regulation dieses Transportsystems (50). Im Gegensatz zur Aufnahme von AIB via System A, die in Gegenwart von Glucagon und Dexamethason eine lag-Phase von von 3-6 Stunden zeigt und nach 24 Stunden bereits wieder vollständig abgeklungen ist, wurde für die Aufnahme von Histidin via System N unter den entsprechenden hormonellen Bedingungen eine lag-Phase von ungefähr 3 Stunden und eine um das etwa dreifache erhöhte Transportkapazität nach 24 Stunden gefunden. Wie bei System A wurde für die beiden Pankreashormone Insulin und Glucagon allein und auch für Dexamethason allein eine stimulierende Wirkung gezeigt. Die Kombination der Pankreashormone mit dem Glucocorticoid hingegen bewirkte eine größere Steigerung der Transportraten, ohne daß eindeutig zwischen einer additiven oder permissiven Wirkung des Glucocorticoids unterschieden werden konnte. Diese Befunde machen es wahrscheinlich, daß die hormonelle Regulation des Aminosäuretransportsystems N einer eigenen, von der Regulation des Systems A unabhängigen, Kontrolle unterliegt.

Die komplexe hormonelle Regulation von System N weist, zusätzlich zur bloßen Existenz dieses ausschließlich in der Leber vorkommenden Transportsystems, auf die besondere Rolle der Leber im Stoffwechsel von Glutamin hin (50,54). Die besondere Bedeutung dieses Natrium-abhängigen Transportsystems für die Aufnahme von Glutamin in die Hepatozyten wurde zuerst von Fafournoux et al. (34) vermutet,

die einen bidirektionalen Transport von Glutamin über die Plasmamembran berichteten. Die Aufnahme sollte dabei überwiegend über System N erfolgen, während die Abgabe mittels einer Natrium-unabhängigen Komponente mit einem hohen Km-Wert stattfindet. Beide Komponenten konnten durch Histidin gehemmt werden. Untersuchungen an der perfundierten Leber von Häussinger et al. (81) lieferten konkrete Hinweise auf eine geschwindigkeitsbestimmende Funktion des Transports durch die Plasmamembran zumindest unter bestimmten Bedingungen.

Seit den Untersuchungen von Hems et al. (70) an Leberscheibchen war die Ansicht weit verbreitet, daß Glutamat von parenchymalen Leberzellen praktisch nicht aufgenommen werden kann. Von Sips et al. (174) wurde allerdings in isolierten Membranvesikeln ein hochaffines Transportsystem gefunden, das jedoch eine relativ niedrige Kapazität hatte. Auch in Hepatomzellkulturen (110) und in Hepatozytenprimärkulturen (42,133) wurde der Natrium-abhängige Glutamattransport untersucht und charakterisiert. In Studien an perfundierter Rattenleber wurde gezeigt, daß nach Zugabe von ^{14}C-Glutamat die Radioaktivität als $^{14}CO_2$ und in anderen markierten Verbindungen auftritt, was auf eine Aufnahme und anschließende Metabolisierung hinwies (187).

Von Christensen (22) wurde für eine Reihe von Transportsystemen, die selektiv anionische Aminosäuren transportieren, eine Einteilung vorgenommen und eine Benennung vorgeschlagen: System x^-_A, für ein System, das Natrium-abhängig Aspartat und Analoga mit kürzerer Kettenlänge transportiert, System x^-_{AG}, ein Natrium-abhängiges Transportsystem, das gleichwertig Aspartat und Glutamat akzeptiert und System x^-_G, das Natrium-abhängig Glutamat und seine Analoga, nicht aber Aspartat und andere kürzere Analoga, transportieren kann. Die physiologische Bedeutung dieser Glutamattransport-

systeme blieb aber wegen der, im Vergleich zur Natrium-unabhängigen Aufnahme sehr geringen Aufnahmeraten, weiterhin unklar.

Von Gebhardt & Mecke (51) wurde in Hepatozytenkulturen erstmals eine Induktion des Natrium-abhängigen Glutamat-transports durch Dexamethason beschrieben. Diese hormonelle Kontrolle erstreckte sich ausschließlich auf den Natrium-abhängigen Teil des Transports. Dieses Transportsystem transportierte ebenfalls Glutamat und Aspartat gleichwertig und benötigte zum elektroneutralen Cotransport jeweils zwei Natriumionen zur Aufnahme (51). Die Aufnahme von Glutamat konnte durch Cysteat spezifisch gehemmt werden. Substrate der Systeme A,N und ASC hatten keine Einfluß (51). Eine ausführliche Charakterisierung der hormonellen Regulation dieses Transportsystems, das von den Autoren als System G^- benannt wurde, findet sich bei Gebhardt (44). Die starke Induktion durch Dexamethason tritt erst nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden auf. Die Pankreashormone Insulin und Glucagon haben im Gegensatz zu der überwiegend stimulierenden Wirkung bei System A einen etwas andersgearteten Einfluß. Insulingabe allein hemmt den Transport via System G^-. Außerdem wirkt es der stimulierenden Wirkung von Dexamethason entgegen. Glucagon allein zeigt keinen Effekt. Die Gabe von Glucagon zu mit Dexamethason induzierten Kulturen zeigte, abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe, einen komplexen Einfluß auf die Aufnahmekapazität.

Durch die extrem heterogene Verteilung von Glutaminsynthetase in einem kleinen Teil der perivenösen Zone (52) und der Postulierung eines interzellulären Glutaminzyklus (72), war die Untersuchung der Transportsysteme, die Substrate für die damit verbundenen Stoffwechselwege wie Gluconeogenese und Glutaminsynthese zur Verfügung stellen und auch für die Glutaminfreisetzung wichtig sein können, und ihre Lokalisierung im Acinus im Rahmen dieser Arbeit von besonderem In-

teresse. Bisher wurden nur von Häussinger et al. (74) in metabolischen Studien an perfundierter Rattenleber Hinweise auf eine vorwiegend perivenöse Lokalisation der Glutamataufnahme geliefert.

1.4 Methoden zur Untersuchung und Trennung von Leberparenchymzellpopulationen

Auf der Basis der ausgeprägten zonalen Heterogenitäten von morphologischen und biochemischen Eigenschaften der Hepatozyten im Leberacinus (62,92) wurden in jüngster Zeit zunehmend Evidenzen auch für eine funktionelle Heterogenität zwischen verschiedenen acinären Bereichen gefunden (154,92). Die bisher gewonnenen Erkenntnisse basierten hauptsächlich auf mikroskopischen Methoden in Verbindung mit morphometrischen, histochemischen und immunhistochemischen Verfahren (Ausführliche Übersichten, hauptsächlich auch in Bezug auf die Anwendung an Lebergewebe, siehe 163,97,4).

Mehr quantitative Ergebnisse wurden durch Mikrodissektion von Zellen aus verschiedenen acinären Zonen in Verbindung mit enzymatischen Analysenmethoden erhalten (Übersicht bei 97). Diese elegante und selektive Technik benötigt allerdings oft, bedingt durch die geringe Ausbeute an verschiedenen Leberzellen, speziell angepaßte enzymatische Mikroanalyseverfahren (97). Parenchymale Zellen lassen sich praktisch nicht von nichtparenchymalen Zellen trennen. In Verbindung mit neuen Techniken, wie "Mikrolight guides" (86) und Miniatur-Sauerstoffelektroden (87), bieten sich jedoch durchaus interessante methodische Weiterentwicklungen zur Untersuchung heterogener Funktionen im Acinus. Der hohe

technische Aufwand muß allerdings gegenwärtig als Einschränkung für eine verbreitetere Anwendung dieser Methoden angesehen werden. Ein ausgezeichneter Überblick über eine Vielzahl von verschiedenen qualitativen und quantitativen histochemischen Methoden, die bei der Untersuchung von Lebergewebe verwendet wurden, findet sich in 104.

Aus klinischen Beobachtungen war schon lange bekannt, daß die Verabreichung verschiedener Xenobiotica in einer selektiven Schädigung einer bestimmten acinären Zone resultieren kann (197,160). So sind Substanzen wie Acetaminophen (27,159,24), Halothan (198), Tetrachlorkohlenstoff (139), Brombenzol (111) und Phalloidin (160) Beispiele, neben anderen Stoffen (197), die selektiv oder wenigstens überwiegend perivenöse Hepatozyten schädigen können. Dagegen wurden für eine selektive Schädigung des periportalen Areals weitaus weniger Substanzen gefunden. Dazu gehören unter anderem Allylformiat (151), Ngaion in niedrigen Dosen (168) gelber Phosphor (117), hohe Dosen an Gallensäuren (60) und das Karzinogen N-hydroxy-2-acetyl-aminofluoren (N-OH-AAF) (180). Auf die Mechanismen der toxischen Wirkung der einzelnen Substanzen, die für die Selektivität der Leberschädigung verantwortlich ist, soll in diesem Rahmen nicht eingegangen werden. Die Verwendung einiger dieser Substanzen zur selektiven regionalen Schädigung der Leber hat in Verbindung mit Methoden, die zum Teil bereits weiter oben vorgestellt wurden, außer zur Aufklärung der Enzymverteilung und der Lokalisation biotransformierender Stoffwechselwege (85,195), auch zum besseren Verständnis der Heterogenität im Ammoniak- und Aminosäurestoffwechsel beigetragen (75,51,46,47).

Von Quistorff et al. wurde durch eine kurzzeitige Infusion von Digitonin, einem Cholesterin komplexierenden Agens, eine selektive Zerstörung entweder des periportalen oder des perivenösen Teils des Acinus in Abhängigkeit von

der Infusionsrichtung erreicht, die zur Untersuchung der heterogenen Verteilung einiger Enzyme verwendet wurde (146).

Perfusionsexperimente an der isolierten Leber (172), die im Gegensatz zu den weiter oben beschriebenen histologischen und histochemischen Methoden ein strukturell und funktionell intaktes System darstellt, können, in Verbindung mit verschiedenen Methoden zur Lokalisierung und der entsprechenden kinetischen Analyse, wertvolle Ergebnisse zur Untersuchung von Unterschieden in der Lokalisation von Stoffwechselwegen und Transportsystemen liefern. Während antegrader oder retrograder Perfusion entstehen Substratgradienten, die die direkte Messung von metabolischen Flußraten in der perivenösen oder periportalen Zone erlauben. Ante- und retrograde Perfusionsuntersuchungen an der isoliert perfundierten Leber (76) bildeten, zusammen mit Ergebnissen aus immunhistochemischen (52) und quantitativen histochemischen Untersuchungen (94), die Grundlage für die Formulierung des Konzepts des "interzellulären Glutaminzyklus" (173,79).

Die wachsende Erkenntnis der Bedeutung der acinären Heterogenität für eine Vielzahl von Stoffwechselwegen lenkte das Interesse natürlich zunehmend auf die Entwicklung von Methoden zur Isolierung von Hepatozyten aus den verschiedenen Zonen des Acinus. Die Isolierung von periportalen und perivenösen Hepatozyten ist die einzige Methode, die umgebungsbedingte Unterschiede, wie sie im Acinus vorkommen, ausschließen kann. Mit isolierten Hepatozyten aus verschiedenen Bereichen des Azinus können Experimente durchgeführt werden, in denen alle Zellen der gleichen Umgebung ausgesetzt sind. Damit sollte es möglich sein, funktionelle Unterschiede zwischen Hepatozyten einzelner Zonen direkt nachzuweisen. Durch Kultivierung dieser Zellen unter identi-

schen Bedingungen wäre es möglich, der Frage nachzugehen, in wieweit anfängliche Unterschiede von Enzymaktivitäten oder anderen Funktionen auf Unterschiede in der sinusoidalen Mikroumgebung zurückzuführen sind. Regulation von Stoffwechselwegen, Proliferationsverhalten und Differenzierung von Hepatozyten aus den verschiedenen Bereichen des Acinus können in der Kultur gezielt untersucht werden.

Prinzipiell ist es denkbar, Zellen entweder direkt aus den einzelnen Zonen zu isolieren, oder aber zuerst eine Gesamtzellsuspension zu isolieren und daraus dann Zellen der unterschiedlichen Bereiche auf Grund von Unterschieden in der Morphologie oder Oberflächeneigenschaften aufzutrennen. Zur eindeutigen Zuordnung von isolierten und aufgetrennten Zellpopulationen zu ihrem acinären Ursprung ist es nötig, geeignete Marker zu verwenden. Da acinäre Unterschiede in den Aktivitäten einzelner Enzyme hauptsächlich aus Mikrodissektionsstudien bekannt waren, wurden hauptsächlich solche Enzyme, für die bis dahin die stärksten Unterschiede beschrieben wurden (94), als Marker für den acinären Ursprung der Zellen verwendet.

Aus den periportal:perivenös-Verhältnissen ist zu ersehen, daß die meisten dieser Enzymaktivitäten nur schwache Gradienten entlang des Acinus aufweisen, die oft nur wenig niedriger als 0,5 bzw. höher als 2 liegen. Obwohl dies prinzipiell, vor allem bei der Verwendung mehrerer Markerenzyme, zur Charakterisierung isolierter Subpopulationen ausreichen sollte, können solch geringe Unterschiede Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse verursachen. So wären z.B. adaptive Änderungen oder Auslaufen von Enzymprotein während der Isolierung Faktoren, die nicht mit Sicherheit auszuschließen sind, und die zu nur schwierig nachzuweisenden Schwankungen der Enzymaktivitäten führen könnten.

In einigen Untersuchungen wurde durch vorherige Mar-

kierung der Zellen einer Zone mit fluoreszierenden Substanzen versucht, die isolierten und aufgetrennten Zellen zu identifizieren (63,178,61). Weiterhin wurde in anderen Studien versucht, die intraacinäre Heterogenität durch eine geeignete Vorbehandlung der Tiere zu verstärken. Damit sollte vor allem der Gehalt an Glykogen, endoplasmatischem Retikulum oder Neutralfett in einer Zone erhöht werden (59,191,183).

Untersuchungen zur Ultrastruktur der Hepatozyten zeigten, daß perivenöse Zellen zwar mehr, dafür aber kleinere Mitochondrien als periportale Zellen besitzen und außerdem auch noch einen größeren Anteil an endoplasmatischem Retikulum aufweisen (128,166,153,88). Diese Parameter sollten unter anderem dafür verantwortlich sein, daß die Zellen eine unterschiedliche spezifische Dichte haben, und es deshalb möglich sein sollte, die Zellen mittels Gleichgewichtsdichte-Zentrifugation aufzutrennen. Allerdings darf in diesem Zusammenenhang nicht außer Acht gelassen werden, daß der im Acinus ungleichmäßige Gehalt an Glykogen und Neutralfett einen weitaus größeren Einfluß auf die spezifische Dichte der Zellen haben kann. Der Gehalt an Glykogen und Neutralfett kann großen tageszeitlichen und ernährungsbedingten Schwankungen unterliegen. Weitere Parameter, die die Dichte der Zellen beinflußen könnten, sind die Zahl der Zellkerne in den Hepatozyten und der Ploiditätsgrad. Über eine zonale Heterogenität dieser beiden letzten Parameter gibt es bisher keine gesicherten Befunde.

Zur Herstellung von Dichtegradienten zur Auftrennung von Zellen wurden in der Vergangenheit eine ganze Reihe von Gradientenmaterialien verwendet (123). Im folgenden werden einige Arbeiten zur Auftrennung von isolierten Hepatozyten vorgestellt, die entweder Ficoll® (Pharmacia), ein Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von etwa 400.000 d oder

Percoll® (Pharmacia), eine Suspension aus mit Polyvinylpyrrolidon beschichtetem kolloidalem Kieselgel oder Metrizamid (Nyegaard & Co.), ein 2-Desoxyglucosamin mit einer peptidisch gebundenen substituierten 3-Jod-Benzoesäure, als Gradientenmaterial verwendeten.

Die beschriebenen Versuche erbrachten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So wurde in einigen Untersuchungen die Auftrennung der Zellen in einzelne diskrete Banden beschrieben (59,31,18,8,137). Da die weiter oben aufgeführten Unterschiede in der Ultrastruktur der Zellen allerdings relativ gering sind und auch nicht stufenartig auftreten, ist eine Auftrennung der Zellen in diskrete Banden überraschend. Viel eher wäre eine Verteilung der Zellen in einer einzelnen Bande zu vermuten. Eine Methode, die eine glockenförmige Verteilung der Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation erbrachte, wurde von Bengtsson et al. (7) beschrieben.

Eine Reihe von Arbeiten beschreibt die Auftrennung der Zellen in diskontinuierlichen Stufengradienten (183,192). Diskontinuierliche Gradienten können allerdings erst dann sinnvoll eingesetzt werden, wenn bekannt ist, daß die aufzutrennenden Zellen eine diskrete und reproduzierbare Dichte aufweisen. Methodische Probleme könnten auch dadurch entstehen, daß Zellen, die an einer Stufe liegenbleiben, andere am Erreichen ihrer Endposition behindern können.

Zur besseren Trennung wurden in einigen Untersuchungen die Tiere vorbehandelt, um die Dichte der Hepatozyten in einer spezifischen Zone zu verändern. So wurde z.B. versucht, durch Vorbehandlung mit Phenobarbital, das eine Induktion der Proliferation des endoplasmatischen Retikulums der perivenösen Zellen bewirkt (59,191), eine bessere Trennung der Zellen zu erreichen (59). Dieselbe Gruppe beschrieb eine Behandlung mit Glucose und Insulin, um den Glykogengehalt der Zellen zu verändern (161). Die Autoren

berichten vor allem mit der Phenobarbitalbehandlung eine bessere Trennung der Zellen. Jedoch dürfte die Vorbehandlung selbst die Nützlichkeit der Methode stark einschränken.

Verschiedene Autoren beschrieben eine Fraktionierung von Hepatozytensuspensionen durch 1-g-Sedimentation auf der Basis ihrer unterschiedlichen Größe (193,185,29). Damit konnten zwar Zellpopulationen, die auf Grund eines unterschiedlichen Ploiditätsgrades auch Unterschiede in ihrer Größe aufweisen (193) isoliert werden (185,29); eine spezifische Zuordnung von Zellen unterschiedlicher Ploidität zu einzelnen Zonen des Acinus scheint jedoch nicht möglich zu sein (33) und deutet wahrscheinlich darauf hin, daß diese Methode für die Gewinnung von Zellen aus verschiedenen acinären Bereichen nicht brauchbar sein dürfte.

Eine weiteres Zentrifugationsverfahren, das zur Auftrennung von Hepatozyten hauptsächlich nach ihrer Größe eingesetzt wurde, war die Elutriation (10,121,190,178). Die Zuordnung von einzelnen Fraktionen zu bestimten acinären Bereichen blieb jedoch fraglich. Sumner et al. versuchten einzelne acinäre Zonen mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren (178); dennoch blieb die Verbindung der elutriierten Fraktionen zu einer bestimmten acinären Zone unklar.

Da es durchaus denkbar ist, daß Zellen des afferenten bzw. efferenten Teils des Acinus unterschiedliche Oberflächeneigenschaften aufweisen könnten, wurden von einigen Autoren Methoden verwendet, die auf unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften beruhen. So wurden "Free-flow-Elektrophorese" (135) und Verfahren, die auf der unterschiedlichen Verteilung von Zellen in wässerigen Dextran- und Polyäthylenglykolphasen basieren (37,166), zur Fraktionierung von Leberzellsuspensionen eingesetzt. Für eine Anwendung dieser Verfahren zur Isolierung von perivenösen und periportalen

Zellen wäre es jedoch wichtig, zuerst Befunde zu erhalten, aus denen auf unterschiedliche Oberflächeneigenschaften der Zellen geschlossen werden kann.

Durch Affinitätsadsorption an mit Concanavalin beschichtete Nylonscheibchen gelang es Rojkind et al., Hepatozytenpopulationen zu isolieren, die Lectinrezeptoren an ihren Oberflächen haben (157). Von diesen Zellen wurde berichtet, daß sie unterschiedliche Kapazitäten für die Glykogensynthese aufweisen, was wegen der Heterogenität des Glykogenmetabolismus (164) auf Zellen aus unterschiedlichen acinären Zonen hinweisen könnte. Auch Unterschiede in der Rezeptordichte oder -affinität auf Grund von Hormongradienten entlang des Sinusoids wären denkbar.

In jüngster Zeit wurden Verfahren beschrieben, die es ermöglichen sollen, im Gegensatz zu den oben beschriebenen, die mehr auf physikochemischen Parametern beruhen, die Zellen direkt aus den entsprechenden acinären Bereichen zu isolieren.

Von Gumucio et al. wurde behauptet, daß bereits bei der Durchführung einer konventionellen Zellisolierung mittels Kollagenaseverdau und anschließend nachgeschalteter Percollzentrifugation zur Abtrennung von geschädigten Zellen, je nach Perfusionsrichtung, bevorzugt Hepatozyten aus dem proximalen Teil des Acinus herausgelöst werden (61). Zur Markierung der jeweiligen Zellpopulationen wurde vor der Isolierung eine Anfärbung von Zellen der entsprechenden Bereiche mit Acridinorange durchgeführt. Durch Versuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit mehr selektiven Markern durchgeführt wurden, konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigt werden.

Durch antegrade oder retrograde Infusion von Kollagenase und gleichzeitige Gegenspülung mit einem Kollagenase-

freien Medium gelang es Väänänen et al., Zellen bevorzugt aus dem perivenösen und dem periportalen Bereich des Acinus zu isolieren (189). Bei dieser Kollagenase-Gradientenperfusion werden die infundierten Medien durch die Leberkapsel herausgedrückt. Messungen verschiedener Markerenzyme zeigten eine gute Trennung der Hepatozyten. Da der Anteil der geschädigten Zellen in der Ausgangszellsuspension mit 70-90% sehr hoch liegt, erhält man mit dieser Methode nur geringe Ausbeuten an intakten Hepatozyten (125).

Selektive zonale Schädigung der Leber durch Behandlung mit bestimmten lebertoxischen Substanzen wurde, wie bereits weiter oben beschrieben, zur Lokalisation von Stoffwechselwegen des Ammoniak- und Glutaminstoffwechsels erfolgreich eingesetzt (52,75,51,46,47). Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde von Quistorff (147) und Lindros & Penttilä (126) ein Verfahren zur direkten Isolierung von perivenösen und periportalen Hepatozyten nach zonaler Leberschädigung vorgestellt. Diese Autoren verwenden die Cholesterin-komplexierende Wirkung von Digitonin zur selektiven Schädigung von Zellen nur eines Teils des Acinus. Die Zellen aus dem intakten Teil werden anschließend mittels konventioneller Kollagenaseperfusion isoliert. Die Selektivität dieser Methode wird zwar als leicht geringer als bei der Kollagenasegradientenperfusion beschrieben, sie zeichnet sich hingegen durch eine hohe Ausbeute an intakten Zellen aus. Die genaue Durchführung dieser Methode und eine Charakterisierung der erhaltenen Zellsuspensionen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausführlich beschrieben.

1.5 Ziel der Arbeit

Das Modell der metabolischen Zonierung lieferte zum erstenmal ein über eine beschreibende Darstellung hinausgehendes funktionelles Gesamtkonzept der Stoffwechselregulation. Die Gültigkeit dieses ursprünglich nur für den Kohlehydratstoffwechsel entwickelten Modells (94,92) konnte in jüngster Zeit auch für den Aminosäure- und Ammoniakmetabolismus gezeigt werden (79,54). Die speziellen Verhältnisse der zonalen Verteilung der daran beteiligten Stoffwechselwege und von Schlüsselenzymen führten für den Glutaminmetabolismus zur Aufstellung des Modells des "interzellulären Glutaminzyklus", das der besonderen Lokalistion dieser Stoffwechselwege, die nicht mit der üblicherweise vorgenommenen Einteilung des Acinus übereinstimmt, Rechnung trägt (53,54,79,173). Eine genaue Kenntnis der Verteilung der beteiligten Transportsysteme, die, wie am Beispiel des Transports von Alanin gezeigt werden konnte (175,35), einen entscheidenden Einfluß auf die Kontrolle des Stoffwechsels haben könnten, ist eine der Voraussetzungen für ein Verständnis der Stoffwechselregulation. Aus diesen Gründen sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, einen Einblick in die Verteilung der Transportsysteme, die dem Stoffwechsel von Glutamin und Glutamat zuzurechnen sind, zu gewinnen.

Aufklärung über eine mögliche Zonierung sollte durch die Verwendung von isolierten und kultivierten Hepatozyten, nach Trennung in perivenöse und periportale Subpopulationen erhalten werden. Mit der Entdeckung der extremen Heterogenität der Glutaminsynthetase im Leberacinus (52) stand ein ideales Markerenzym für perivenöse Zellen zur Verfügung. Da zu Beginn dieser Arbeit noch kein geeignetes Verfahren zur Trennung von periportalen und perivenösen Hepatozyten, das gleichzeitig eine eindeutige Zuordnung der Zellen zu ihrem

Herkunftsort erlaubt, vorhanden war, sollte versucht werden einige bislang verwendete Verfahren zur Trennung einzusetzen, und die erhaltenen Zellpopulationen vor allem mit Hilfe des enzymatischen und immunhistochemischen Nachweises von Glutaminsynthetase zu charakterisieren. Dazu sollte Glutaminsynthetase aus Rattenleber gereinigt und ein Antiserum gegen dieses Enzym hergestellt werden. Gleichzeitig sollte durch verschiedene immunologische Ansätze versucht werden, Grundlagen für eine Trennung und weitere Charakterisierung von periportalen und perivenösen Hepatozyten auf Grund von möglicherweise unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften zu schaffen.

2 Versuchstiere, Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit männlichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 200-300 g durchgeführt. Die Tiere wurden von der Tierzuchtanstalt Tuttlingen geliefert oder stammten aus hauseigener Weiterzucht. Die Tiere erhielten eine Standarddiät (Alma®, Botzenhart) und Wasser ad libitum. Alle Tiere wurden in einem kontrollierten 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper, für die Isolierung von peritonealen Makrophagen und zur Induktion von Aszites wurden weibliche Balb/c-Mäuse von der Versuchstierzucht Tuttlingen verwendet, die eine Standarddiät (Alma®, Botzenhart) und Wasser ad libitum erhielten.

Für die Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen Glutaminsynthetase wurden ca. 6-8 Wochen alte männliche Kaninchen, die von einem ortsansässigen Züchter bezogen wurden, verwendet. Die Tiere erhielten eine Standarddiät (AlmaR, Botzenhart) und Wasser ad libitum.

2.2 Geräte

Sonifier	Branson sonic Power Corp. (Danbury, U.S.A.)
Autoklav FO/3-Z1	Fedegari (Padua, Italien)
CO_2-Brutschränke	Heraeus (Osterode)

Sterile Werkbank, Horizontalstrom	Aircontrol (Norristown,U.S.A.)
Sterile Werkbank, Horizontalstrom	Centronic (Berlin)
Sterile Werkbank, Vertikalstrom	Ceag (Bork)
Minipuls-Schlauchpumpe	Gilson (Villiers-le-Bel, Frankreich)
Perfusor V	Braun (Melsungen)
Durchlichtmikroskop "Ortholux"	Leitz (Wetzlar)
Invertmikroskop "Diavert"	Leitz (Wetzlar)
Bildanalysesystem	Grude (München)
Einstrahlphotometer PM 4	Zeiss (Oberkochen)
Zweistrahlphotometer Shimadzu UV140	Shimadzu (Seisakoshu, Japan)
Microplate Reader MR 600	Dynatech
Eppendorf-Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Labofuge III	Heraeus-Christ (Osterode)
Ultrazentrifuge L5-65	Beckmann (Stuttgart)
Elektrophoreseapparatur	LKB (Schweden)
Transphor-Transfereinheit	LKB (Schweden)
Szintillationszähler betaszint BF 5000	Bertold (Pforzheim)
Potter S Homogenisator	Braun (Melsungen)
Ultra-Turrax	Bachofer (Reutlingen)
Certomat Laborschüttler	Braun (Melsungen)
IBM PPC, IBM AT	IBM (U.S.A.)

2.3 Verbrauchsmittel

2.3.1 Materialien

Petrischalen TC-Qualität 60 mm, 100mm	Greiner (Nürtingen)
PS-Gewebekulturplatte,F-Form (96-Trog-Platten,steril)	Greiner (Nürtingen)
24-Trog-Kulturplatten (Costar)	Tecnomara (Ruhberg)
Gewebekulturflaschen 50,100,500ml(Falcon)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Einmalpipetten (Plastik, steril)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Membranfilter	Sartorius (Göttingen)
Polyallomer Zentrifugenröhrchen	Beckmann (Stuttgart)
Küvetten, Halbmikromaßstab	Sartorius (Göttingen)
Plastikzentrifugengläser, mit Deckel, steril	Sarstedt (Nombrecht)
Einfrierröhrchen,steril	Sarstedt (Nombrecht)
Filterpapier 3MM, Whatman	Herolab (St. Leon Rot)
Nitrocellulose, 0,8 µm	Bio-Rad (München)
Plastikreagenzgläser	Sarstedt (Nombrecht)
Spritzen und Kanülen (Multimed), diverse Größen, Luer Lok	Wicker & Löscher (Kirchheim)
Braunülen, Adaptoren	Braun (Melsungen)
Objektträger und Deckgläschen	Kästner (Weilheim)
Silikonschläuche	Schwäbische Glasindustrie (Dornstadt)

2.3.2 Fertigmedien, Chemikalien, Enzyme, Hormone

3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma (München)
ABTS	Boehringer (Mannheim)
Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Allylformiat	ICN Pharmaceuticals (Plainview, U.S.A.)
Amidoschwarz	Serva (Heidelberg)
Aminosäuren, nichtessentiell	Sigma (München)
Aminotriazol	Sigma (München)
Aqualuma Plus-Szintillator	Baker (Deventer, Holland)
Bisacrylcysteamin	Bio-Rad (München)
Cibacron Blue F3GA	Ciba (Basel, Schweiz)
Coomassie-Brilliant-Blue	Serva (Heidelberg)
DEAE-Sephacel	Pharmacia (Freiburg)
DMEM	Flow Laboratories
DePeX	Serva (Heidelberg)
Dexamethason	Sigma (München)
Diaminobenzidin	Sigma (München)
Digitonin	Fluka (Buchs,Schweiz)
Dimethoxypropan	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol	Sigma (München)
Dowex-1x8	Serva (Heidelberg)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Eukitt	Kindler (Freiburg)
Freund's Adjuvans, inkomplett	DIFCO (Detroit, U.S.A)
Freund's Adjuvans, komplett	DIFCO (Detroit, U.S.A)
Glucagon	Sigma (München)
Glutardialdehyd	Sigma (München)
HEPES	Sigma (München)
Hydroxylapatit(fast flow)	Behring (La Jolla, U.S.A)
Hämatoxilin	Merck (Darmstadt)
Insulin	Sigma (München)

Kollagenase	Sebio (Walchsing)
Kollagenase	Cooper Biomedical (U.S.A.)
Kollagenase	Boehringer (Mannheim)
Kollagenase	Worthington (U.S.A.)
Kälberserum, fötal	Biochrom (Berlin)
Kälberserum, newborn	Sebio (Walchsing)
MEM	Flow Laboratories (Bonn)
Milchpulver	Locher (Stetten u. H.)
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva (Heidelberg)
Paraformaldehyd	Baker (Deventer, Holland)
Penicillin	Serva (Heidelberg)
Pentobarbital-Natrium	Serva (Heidelberg)
Percoll®	Pharmacia (Freiburg)
Radiochemikalien	Amersham Buchler (Braunschweig)
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Boehringer (Mannheim)
Sephadex G 75	Pharmacia (Freiburg)
Streptomycin	Sigma (München)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Williams Medium E	Flow Laboratories (Bonn)

Alle übrigen Substanzen waren analysenreine Produkte der Firmen Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München).

2.4. Lösungen und Medien

2.4.1. Lösungen für die Hepatozytenisolierungen

Alle Lösungen für die Hepatozytenisolierung wurden in unserem Labor selbst hergestellt.

Präperfusionsmedium (45): pH 7,4	
KCl	5,36 mM
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,77 mM
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,93 mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,34 mM
KH_2PO_4	0,44 mM
EGTA	0,20 mM
HEPES	10,00 mM
NaCl	145,00 mM

Perfusionsmedium (45): pH 7,4	
KCl	5,36 mM
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,77 mM
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,93 mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,34 mM
KH_2PO_4	0,44 mM
HEPES	10,00 mM
NaCl	145,00 mM
Glucose	0,2%
enicillin/ Streptomycin	50 U/ml
Rinderserumalbumin, entfettet	0,2%

Isolationsmedium (45): pH 7,4	
NaCl	137,00 mM
KCl	5,40 mM
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1,20 mM
KH_2PO_4	0,15 mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,79 mM
$CaCl_2$	1,00 mM
Glucose	0,1 %
HEPES	10,00 mM

2.4.2 Medien für die Kultivierung von Myelomzellen und von Hybridomzellen

Als Grundmedium für die Kultivierung der Myelomzellen und der Hybridomzellen wurde Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) verwendet, das von uns mit den notwendigen Ergänzungen versehen wurde:

komplettes DMEM:	500	ml	DMEM
	5,7	ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
	5,7	ml	Natrium-Pyruvat, 100 mM
	5,7	ml	L-Glutamin, 200 mM
	0,28	ml	2-Mercaptäthanol, 0,1 M
	57	ml	fötales Kälberserum
HT-Medium :	500	ml	komplettes DMEM
	5	ml	HT-Stammlösung (10 mM Hypoxanthin 1,6 mM Thymidin)
HAT-Medium :	500	ml	komplettes DMEM
	5	ml	HT-Stammlösung
	5	ml	Aminopterin-Stammlösung (0,04 mM)

2.4.3 Lösungen für die Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Isoosmotische Stammlösung: (SIP)	9 T (v/v)	Percoll® (Pharmacia)
	1 T (v/v)	10 x Isolationsmedium

Die Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten wurde durch Verdünnen der SIP mit Isolationsmedium bis zur gewünschten mittleren Dichte hergestellt.

2.4.4 Lösungen für immunhistochemische Nachweisreaktionen

Phosphatgepufferte Saline (PBS): 0,9 % NaCl-Lösung
10 mM Kaliumphosphatpuffer
pH 7,4

Beschichtungspuffer für ELISA mit GS oder Plasmamembranen als Antigen:
1,5 g Na_2CO_3
2,93 g $NaHCO_3$
ad 1 l mit Aq. dest.

Färbelösung für die ELISA-Substratreaktion (wasserlösliches Produkt):

a) 0,1 M Natriumacetat
0,05 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
b) 40 mM ABTS
c) H_2O_2-Lösung (0,25 mM)

Substratlösung: 20 ml a) + 1 ml b) + 0,2 ml c).

Färbelösungen für die indirekte Peroxidase-Technik und die Peroxidase-Antiperoxidase-Technik (wasserunlösliche Produkte):

a) 0,5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin
2 mg/ml 3-Amino-1-2-4-Triazol
0,01 % H_2O_2

oder

b) 8 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol in 1 ml Dimethylformamid lösen. 18,8 ml H_2O + 1 ml Substrat in DMF, pH mit Eisessig sofort auf 3,7 einstellen und mit festem Natriumacetat auf pH 5 bringen. + 0,03 % H_2O_2

2.5 Antikörper

Ziege-Anti-Maus-IgG (H&L)	Pharmacia P-L (U.S.A.)
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (H&L)	Pharmacia P-L (U.S.A.)
Ziege-Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat	Pharmacia P-L (U.S.A.)
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat	Cappel Lab. (U.S.A.)
Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (entwickelt im Kaninchen)	Sigma (U.S.A)
Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (entwickelt in Maus)	Pharmacia P-L (U.S.A.)
Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-Fluorecein-Konjugat	Dakopatts (Dänemark)

2.6 Experimentelle Leberschädigung

Zur Schädigung periportaler Bereiche des Acinus wurde den Ratten an 3 aufeinanderfolgenden Tagen Allylformiat (i.p. 10-50 µl/kg in Saline mit 50% Ethanol) injiziert.

Perivenöse Areale der Leberacini wurden durch tägliche Injektion von CCl_4 (i.p. 100 µl/kg in einem gleichen Volumen Salatöl) an drei aufeinanderfolgenden Tagen zerstört. Die Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen, um einen fast vollständigen Verlust an GS-positiven Zellen zu erreichen.

2.7 Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten

Die Isolierung der Hepatozyten basierte auf der 2-Stufen-Kollagenase-Perfusionstechnik nach Seglen (169), modifiziert nach (49,44). Verwendete Lösungen und die Durchführung der Zellisolierung wurden ausführlich in den Arbeiten von Metzler (134) und Schirmer (165) beschrieben. Die ursprünglich erhaltene Zellsuspension wurde dreimal bei ca. 5-10 g zentrifugiert und anschließend der Vitalitätsindex durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau bestimmt. Grundsätzlich wurden nur solche Zellpräparationen verwendet, die einen Vitalitätsindex von über 85 % aufwiesen. Zellpräparationen, die in 96-Trog-Mikrotiterplatten (Greiner) kultiviert werden sollten, wurden vor dem Absetzen der Zel-

len in einer Percoll®-Isolationsmedium-Mischung (Dichte 1,06 g/cm² s. Abschnitt 2.4.3) mit 150 g für 10 min. zentrifugiert (113)(Dichte: 1,06 g/cm²), um Trypanblau-positive Zellen möglichst vollständig abzutrennen. Geschädigte Hepatozyten wurden unter diesen Bedingungen nicht pelletiert. Die resuspendierten Zellpräparationen zeigten nach Abtrennen der geschädigten Zellen und Auswaschen des Percolls einen Vitalitätsindex von >97%.

Die Bedingungen für das Absetzen der Zellen sind bei Gebhardt (44) im einzelnen beschrieben. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1,25 x 10^6 Zellen/ml im Kulturmedium resuspendiert und in den Kulturschalen in einer Zelldichte von 1,25 x 10^5 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung der Zellen in 96-Trog-Mikrotiterplatten (Greiner) erfolgte wie bei Schäfer-Degenhardt (167) beschrieben. Pro Trog wurden ca. 25000 Zellen abgesetzt. Bei Verwendung von 24-Trog-Kulturplatten (Costar) wurden die Zellen in einer 1:2,5 verdünnten Suspension ausgesäht. Bei allen Absetzbedingungen sollte die gleiche Zellzahl/cm² erreicht werden. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Zellen in 4-segmentige Kulturschalen, in die zuvor Deckgläschen eingeklebt wurden, abgesetzt. Alle Kulturgefäße wurden vor Einbringen der Zellen mit einem dünnen Kollagenfilm naß beschichtet (49).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte standardmäßig mit Williams Medium E (194) oder Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen und nicht-essentiellen Aminosäuren. Zusätzlich enthielten alle Medien 2 mM Glutamin und Penicillin (50 U/ml)/Streptomycin (50 µg/ml). Zellen, die mit Williams Medium E kultiviert wurden, wurden in einem Brutschrank mit 90% Luftfeuchtigkeit bei 37° C und einer Atmosphäre mit 5% CO_2 in Luft inkubiert. Mit MEM kultivierte Zellen wurden

davon abweichend in einer Atmosphäre mit 7% CO_2 inkubiert. Alle Medien enthielten zum Absetzen der Zellen 10% Kälberserum (Serva). 1-2 h nach dem Absetzen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit Serum-freiem Medium weiterkultiviert. Das Medium wurde täglich erneuert. Die Kulturdauer und die jeweiligen hormonellen Bedingungen werden bei jedem Versuch einzeln beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Hormone in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: Dexamethason (10^{-7} M), Insulin (10^{-7} M), Glucagon (10^{-6} M). Die entsprechenden Kontrollkulturen wurden stets hormonfrei inkubiert.

2.8 Isolierung von Hepatozytensubpopulationen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

2.8.1 Herstellung der Dichtegradienten

Um Hepatozyten in Fraktionen aufgetrennt nach der Dichte der Zellen zu erhalten, wurden die isolierten Hepatozytenpräparationen durch Gleichgewichts-Dichtezentrifugation in Percoll®-Dichtegradienten weiter separiert. Vorgeformte Dichtegradienten (35 ml; Dichte: 1,03-1,12 g/cm³) wurden am Anfang mit einer Gradientenmischkammer aus zwei Percoll-Lösungen unterschiedlicher Dichte (linearer Gradient), später ausschließlich selbstformend ausgehend von einer Percoll®-Lösung mittlerer Dichte (1,08 g/cm²) durch Zentrifugation bei 20000-30000 g für 10-15 min in einem JA 21-Festwinkelrotor (Beckman) in 45 ml-Polyallomerröhrchen bei 4° C hergestellt (S-förmiger Gradient). Die verwendeten Percoll®-Lösungen wurden mit Percoll® (Pharmacia) und zehnfach konzentriertem Isolationsmedium zur benötigten Dichte zusammengemischt. Das Dichteprofil der Gradienten vor und nach Zentrifugation, sowie die Dichte in den aufgetrennten

Fraktionen, wurde zuerst entweder durch Auswiegen oder refraktometrische Bestimmung, später mit Hilfe von Dichte-Markerbeads (Pharmacia) in Kontrollgradientenröhrchen bestimmt.

2.8.2 Gleichgewichts-Dichtegradienten-Zentrifugation

20-30 Mill. Hepatozyten in 10 ml Isolationsmedium wurden sofort nach der Isolierung auf den in einem Zentrifugenröhrchen (45 ml) vorgeformten Dichtegradienten aufgebracht (Verhältnis Zellsuspension:Gradientenvolumen 1:3,5) und bei 150 g für 15 min. in einem Ausschwingrotor (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert. Die Fraktionen (1-2 ml) wurden von unten nach oben abgenommen und Zellzahl, Vitalitätsindex und die Dichte in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Um das Percoll zu entfernen, wurde auf das fünffache Volumen mit 0,9 % NaCl-Lösung aufgefüllt und die Zellen zweimal durch Zentrifugation bei 50 g für 2 min. gewaschen. Danach wurden die Zellen zur Bestimmung der Markerenzyme in 50 mM Tris·Cl-Puffer, pH 7,0 zu einer Zelldichte von nicht höher als 10^6 Zellen/ml aufgenommen. Die Zellen wurden ständig bei 4° C gehalten.

2.9 Isolierung von Hepatozyten mit der Digitonin/Kollagenase-Methode

Die Isolierung von periportalen und perivenösen Hepatozytenpopulationen erfolgte im wesentlichen nach der Digitonin/Kollagenase-Methode von Quistorff (147) und Lindros & Penttilä (126) und soll zusammen mit durchgeführten geringfügigen Modifikationen im folgenden nochmals kurz skizziert werden:

Lösungen und Geräte für die Präparation waren, soweit nicht extra erwähnt, die gleichen wie bei der Isolierung der Hepatozytengesamtpopulation und werden ausführlich bei Schirmer (165) beschrieben. Digitonin (FLUKA,SERVA) wurde durch Aufkochen in Isolationsmedium in Lösung gebracht (7 mM). Die Suspension wurde vorher ultrabeschallt, um eventuell vorhandene Digitoninklumpen zu dispergieren. Nach dem Kochen eventuell noch vorhandene schwache Trübungen konnten durch Filtration beseitigt werden. Die Digitoninlösung wurde in eine 50 ml Plastik-Perfusorspritze mit aufgesetztem Schlauchstück aufgezogen und in einem Wasserbad bei 42° C gelagert, um ein Ausfallen des Digitonins zu vermeiden. Alle weiteren Lösungen, die zur Perfusion der Leber benötigt wurden (165), wurden auf 37° C thermostatisiert und mit O_2 begast.

Nach Narkotisierung der Ratte und Eröffnen des Bauchraums, wurden Ligaturen um die Pfortader und den distalen Teil der unteren Hohlvene vorbereitet. Nach Kanülierung der Pfortader und Aufschneiden der unteren Hohlvene in ihrem distalen Teil wurde die Leber für ca. 10 min. mit warmem Isolationsmedium blutfrei gespült. Inzwischen wurde nach Eröffnen des Thorax die untere Hohlvene herznah angeschnitten und mit einer weiteren Ligatur ein eingeführtes Braunülenverweilteil als Abfluß fixiert. Die untere Hohlvene wurde durch Zuziehen der dort liegenden Ligatur geschlossen. Bei jeder Präparation wurde der rechte, oben liegende, kleine Leberlappen mit einer weiteren Ligatur abgeschnürt und für Kontrollmessungen abgeschnitten. Der Lappen wurde bei -20° C eingefroren.

Die Infusion von Digitonin erfolgte entweder retrograd oder antegrad durch einfaches Umstecken der Schlauchverbindungen. Bei retrograder Infusion wurde bereits kurz vor Digitonininfusion die Perfusionsrichtung des Isolationsmediums gewechselt. Das Umstecken dauerte in der Regel ca. 1

sec., wobei darauf geachtet werden mußte, daß bei dieser Manipulation keine Luftbläschen in die Leber gerissen wurden. Die Infusion der Digitoninlösung erfolgte mit 2 ml/min. (Perfusor; Braun, Melsungen) für 45-75 sec. (für perivenöse Zellen) bzw. für 75-120 sec. (für periportale Zellen). Die genaue Dauer der Digitonininfusion wurde bei jeder Präparation durch optische Beurteilung der aufgetretenen Schädigung bestimmt. Danach wurde das Digitonin mit Ca^{++}-freiem Präperfusionsmedium in der jeweiligen Gegenrichtung herausgespült (10 min.), wobei darauf geachtet wurde, daß es zu keinem Stau in der Leber kam. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde entsprechend reguliert. Die nachfolgende Dissoziation des Lebergewebes erfolgte stets in antegrader Richtung (eventuell nochmals Umstecken der Schlauchverbindungen) und wurde durch Aufstecken einer Schlauchverbindung auf das Braunülenverweilteil in der unteren Hohlvene und dessen Zurückführung in den Vorratskolben für das Perfusionsmedium rezirkulierend in situ durchgeführt. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde mit einer zweiten Schlauchpumpe bei etwa 10 ml/min konstant gehalten.

Alle übrigen Schritte, einschließlich denen der differentiellen Zentrifugation, entsprechen denen der normalen Hepatozytenisolierung. Die Vitalität der erhaltenen Zellpräparationen war mit 80 % ± 14 % im Durchschnitt nur wenig niedriger als bei der normalen Hepatozytenpräparation.

2.10 Isolierung von Zytoplasmamembranen

Mit dem Ziel, Antiseren gegen Oberflächenantigene von Hepatozyten zu gewinnen, wurden als Antigenmaterial Zytoplasmamembranfraktionen aus 48 h alten Hepatozytenkulturen, die durchgehend in Gegenwart von 10^{-7} M Dexamethason kultiviert wurden, bzw. aus Kulturen von mit CCl_4 geschädigten

Lebern, isoliert. Die Isolierung der Membranen wurde nach der Methode von Chakravarthy et al. (19) aus 48 h alten Monolayerkulturen durchgeführt. Dabei wurden die Membranen auf diskontinuierlichen Percoll®-Gradienten aufgetrennt. Die verwendeten Lösungen und die einzelnen Schritte der Aufarbeitung der Zellkulturen sowie die Isolierung werden ausführlich von Locher (127) beschrieben und werden daher hier nicht näher erläutert. Die Qualität der Membranpräparationen wurde über die Aktivitätsverteilung von Markerenzymen im Zellhomogenat und in den Fraktionen beurteilt. Während der Etablierung der Methode wurden 5'-Nukleotidase, Leucinaminopeptidase, Glucose-6-Phosphatase (microsomal) und Glutaminase (mitochondrial) als Markerenzyme verwendet (127). Routinemäßig wurde später nur noch die Aktivität der 5'-Nukleotidase bestimmt.

2.11 Reinigung der Glutaminsynthetase aus Rattenleber

Zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums wurde das Enzym nach einer Kombination der Reinigungsverfahren von Tate et al. (179), Ronzio et al. (158) und Jaenicke & Berson (84) aufgereinigt. Die einzelnen Reinigungsschritte werden in ihrer Aufeinanderfolge nachstehend kurz beschrieben:

Schritt 1: Acetonpulver und -extraktion:

Gesammelte, tiefgefrorene Leber von 70 Ratten wurde bei 4° C im Ultra-Thurrax in 3-4 Vol. Aceton homogenisiert. Die Suspension wurde auf 10 Vol. Aceton aufgefüllt und das Aceton über eine Glas-Nutsche abgesaugt. Das zurückbleibende Pulver wurde 3x mit Aceton gewaschen und über H_2SO_4 getrocknet. Das Acetonpulver wurde in Lösung A (240 g Pulver/ 1,8 l Lösung A ; Lösung A: 150 mM KCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol und 1 mM EDTA) resuspendiert. Der pH wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Die Suspension wurde 30 min bei 26° C im Was-

serbad gerührt und bei 20000 g bei 4° C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde als Acetonextrakt weiterverwendet.

Schritt 2: Säurefällung:

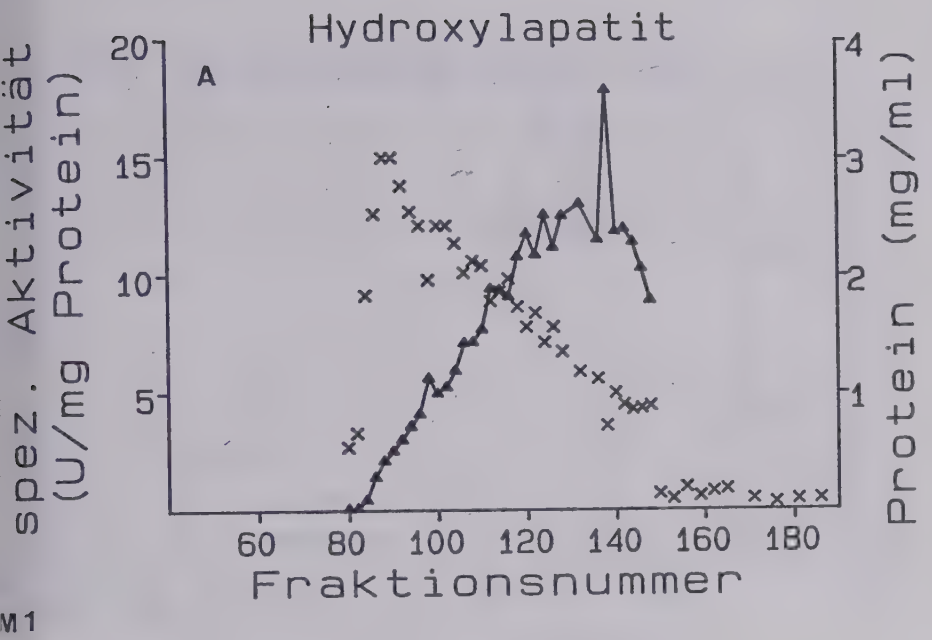
a) Zum Acetonextrakt wurde im Eisbad unter Rühren tropfenweise 1N Essigsäure bis zum pH 5,8 zugegeben und weitere 30 min. bei 4° C gerührt. Der Niederschlag wurde durch 10 min. Zentrifugation bei 16000 g abgetrennt. b) Zum Überstand der pH 5,8-Säurefällung wurde tropfenweise 1N Essigsäure bis pH 5,0 zugegeben und weitere 30 min. bei 4° C gerührt. Der Überstand wurde nach 10 min. Zentrifugation bei 16000 g abgetrennt. Der erhaltene Niederschlag wurde in 200 ml Lösung A (4° C) resuspendiert und der pH mit 1N NH_4OH auf 7,2 eingestellt. Die Suspension wurde ultrabeschallt, über Nacht bei 4° C gerührt und dann bei 20000 g für 20 min. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nochmals mit 130 ml Lösung A reextrahiert und die Überstände vereinigt.

Schritt 3: Ammonsulfat-Fällung:

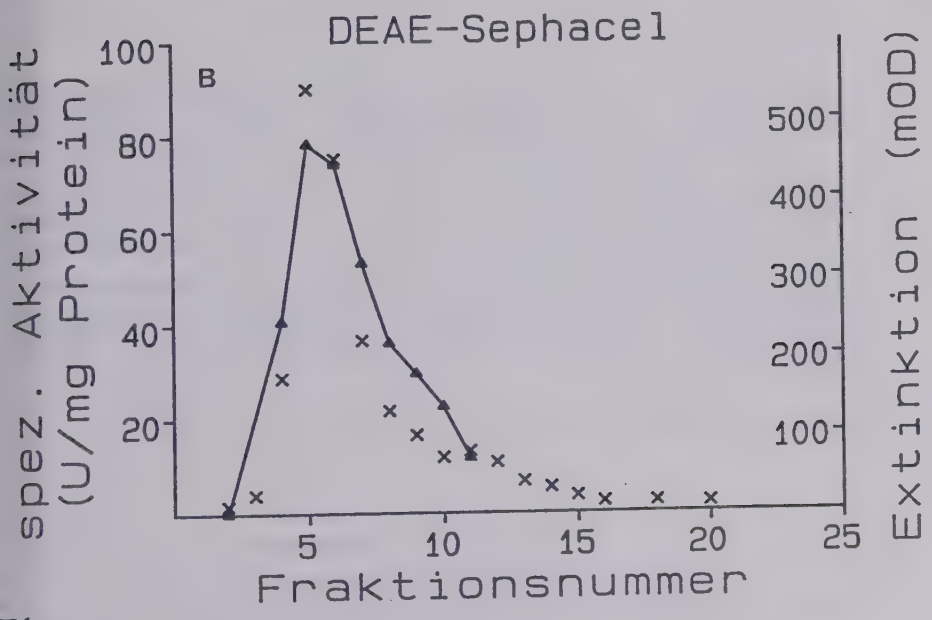
Der Überstand aus Schritt 2 wurde mit 0,258 g pro g festem Ammonsulfat versetzt und für 30 min. gerührt. Anschließend wurde bei 10000 g zentrifugiert (15 min.), der Niederschlag mit 100 ml Lösung A aufgenommen und zum Entfernen von denaturiertem Protein nochmals für 15 min. bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen KM-Puffer (10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,2) dialysiert.

Schritt 4: Hydroxylapatit-Chromatographie (Fast Flow):

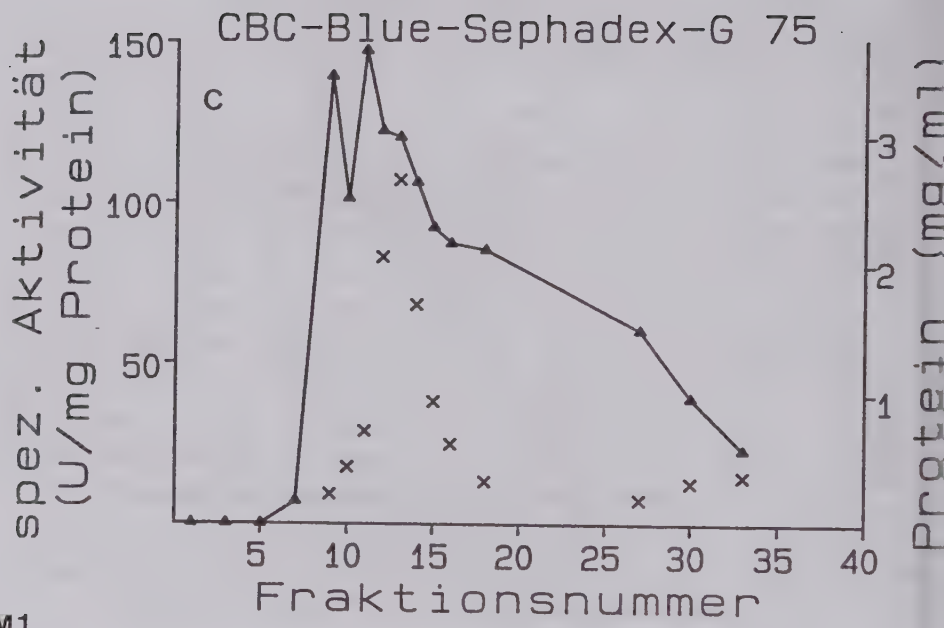
Das Dialysat aus Schritt 3 wurde auf eine mit 10 mM KP-Puffer (Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2), 2 mM DTT) äquilibrierte Hydroxlapatit- Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer gewaschen. Nach Waschen der Säule mit 100 mM KP-Puffer, wobei ein Großteil an Proteinen eluiert wurde, konnte das Enzym mit einem linearen Phosphat-Gradien-


Hydroxylapatit
A
spez. Aktivität (U/mg Protein)
Protein (mg/ml)
Fraktionsnummer
20
15
10
5
4
3
2
1
60
80
100
120
140
160
180

M1


DEAE-Sephacel
B
spez. Aktivität (U/mg Protein)
Extinktion (mOD)
Fraktionsnummer
100
80
60
40
20
500
400
300
200
100
5
10
15
20
25

M1



M1

Abb. M1: A) Elutionsdiagramm der Hydroxylapatit-Chromatographie. Die Elution erfolgte mit einem linearen Phosphatgradienten (150-500 mM). **xxx** Proteingehalt der eluierten Fraktionen; —▲— spezifische GS-Aktivität der Fraktionen bestimmt mit dem γ-Glutamyltransferasetest.

Abb. M1: B) Elutionsdiagramm der DEAE-Sephacel-Chromatographie. Das Enzymprotein wurde in einem Schritt bei pH 6,2 eluiert. **xxx** Proteingehalt (Absorption bei 280 nm); —▲— spezifische GS-Aktivität, bestimmt wie bei A).

Abb. M1: C) Elutionsdiagramm der CBC-Blue-Sephadeg-G75-Affinitätschromatographie. Die Elution des Enzymproteins erfolgte mit 250 mM NaCl in einem Imidazolpuffer (IEM-Puffer). **xxx** Proteingehalt der Fraktionen; —▲— spezifische GS-Aktivität, bestimmt wie bei A).

ten (150 mM - 500 mM, mit 2 mM DTT) eluiert werden. Abb. M1 A zeigt das Elutionsdiagramm, das während der Elution mit dem Phosphatgradienten erhalten wurde. Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen GS-Aktivität wurden vereinigt (Fraktion 107-138) und gegen 10 mM IEM-Puffer (10 mM Imidazol.HCl, 2 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol; pH 7,9) dialysiert.

Schritt 5: DEAE-Sephacel-Chromatographie:

Die vereinigten Fraktionen von Schritt 4 wurden direkt auf eine mit 10 mM IEM-Puffer äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 10 mM IEM-Puffer wurde das Enzym in einem Schritt mit 20 mM IEM-Puffer eluiert (20 mM Imidazol•HCl, 2 mM EDTA und 5 mM 2-Mercaptoethanol; der pH wurde mit Zitronensäure auf 6,2 eingestellt.) (s. Abb. M1 B).

Schritt 6: Cibacron-blue-F3GA-Sephadex-G75-Chromatographie:

Adenosinnukleotid-abhängige Enzymproteine zeigen eine starke Bindung an den Farbstoff Cibacron-blue-F3GA (84) .Die Kopplung des Adenosinnukleotid NAD-Enzym-bindenden Farbstoffes Cibacron-blue-F3GA an Sephadex G75 erfolgte nach Jaenicke & Berson (84). Die vereinigten Fraktionen mit der höchsten spezifischen GS-Aktivität von Schritt 5 (Fraktion 5 u. 6) wurden mit 36 ml/h auf die mit 20 mM IEM-Puffer äquilibrierte Affinitätssäule (30 ml) aufgetragen und die Säule mit 20 mM IEM-Puffer gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte in einem einzigen Schritt mit 250 mM NaCl in 20 mM IEM-Puffer in Fraktionen zu 3 ml und ist in Abb. M1 C dargestellt.

Schritt 7: Präparative Elektrophorese:

Für die Immunisierung sollte das native Enzymprotein durch einen präparativen Elektrophoreseschritt hochrein

erhalten werden. Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden auf ein 7,5 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Leider erbrachten die Versuche, die zur Solubilisierung des Gels (siehe auch Abschnitt 2.12.4) unternommen wurden, nicht das gewünschte Resultat. Das Protein für die Immunisierung wurde deshalb nach Auftennung in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ausgeschnitten und mit dem Acrylamid direkt zur Herstellung der Suspension mit Freund's Adjuvans verwendet.

2.12 Analytische Methoden

2.12.1 Aufarbeitung von Zellkulturen, Herstellen von Homogenaten

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten wurden die Kulturschalen, nach Abgießen des Kulturmediums, durch Abspritzen mit Saline gewaschen. Die Zellen wurden in einem Aliquot Puffer zusammengeschabt und nach Überführung in ein Plastikreagenzglas für 10 s bei Stufe 2-3 (entspricht 30 W) des Polytrongeräts beschallt. Für die Herstellung von Gesamtleberhomogenaten wurde zuerst ein 1:10 Homogenat durch Homogenisieren des Gewebes in einem Dounce-Homogenisator hergestellt und dieses für 15 s bei Stufe 2-3 ultrabeschallt. Weitere Verdünnungen wurden ausgehend von diesem Stammhomogenat hergestellt.

2.12.2 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.12.2.1 Bestimmung der Glutaminsynthetase

2.12.2.1.1 Direkter radioaktiver Test

Die Aktivität der Glutaminsynthetase wurde im radioaktiven Test nach der Methode von Prusiner und Milner (144), modifiziert nach Becher et al. (6) und Gebhardt (45) bestimmt. Hierbei wird die Umwandlung von ^{14}C-Glutamat in ^{14}C-Glutamin gemessen. Das gebildete Glutamin wurde chromatographisch über eine Dowex-1x8-Ionenaustauschersäule von Glutamat abgetrennt. Die Durchführung des Tests ist ausführlich bei Gebhardt (45) beschrieben. Als Glutaminsynthetase-Aktivität wurde nur die ATP-abhängige Aktivität bezeichnet. Die Reaktion verläuft mindestens bis zu einem Umsatz von 2 % des eingesetzten Glutamins linear.

2.12.2.1.2 Direkter chemischer Test (Glutamylhydroxamattest)

Glutaminsynthetase-Aktivität in angereicherten Enzympräparationen wurde über die Bildung von γ-Glutamylhydroxamat aus Glutamat und Hydroxylamin nach Ronzio et al. (158) bestimmt. Die Reaktion verläuft ATP und Mg^{2+} abhängig. 1 µMol γ-Glutamylhydroxamat zeigt unter den Testbedingungen (2,5 ml Endvol.) eine Extinktion von 0,331. Ein Unit (U) wird als 1 µMol gebildetes γ-Glutamylhydroxamat pro min. definiert.

2.12.2.1.3 Indirekter chemischer Test (Glutamyltransferasetest)

Die Aktivität der Glutaminsynthetase wurde über die ebenfalls von der Glutaminsynthetase katalysierte γ-Gluta-

myltransferase-Reaktion ausgehend vom Substrat Glutamin nach Levintow (124) in der Modifikation von Gebhardt & Williams (55) bestimmt. 1 µMol gebildetes y-Glutamylhydroxamat im Testansatz (1,5 ml Endvol.) ergibt eine Extinktion von 0,293 bei einer Meßwellenlänge von 540 nm. Ein Unit (U) wird als 1 µMol gebildetes y-Glutamylhydroxamat pro min. definiert. Diese Reaktion verläuft um ungefähr das zehnfache schneller als die direkte Reaktion, die von Glutamat ausgeht. Dieser Test wurde wegen seiner hohen Empfindlichkeit im Vergleich zum direkten chemischen Test und wegen seiner einfachen Durchführbarkeit im Vergleich zum direkten radioaktiven Test praktisch ausschließlich zur Bestimmung auch geringer Enzymaktivitäten in Gewebeproben und Zellaufschlüssen eingesetzt.

2.12.2.2 Bestimmung der 5'-Nukleotidase

Die Aktivität der 5'-Nukleotidase wurde routinemäßig als Markerenzym für die Beurteilung der Anreicherung bei der Reinigung von Zytoplasmamembranfraktionen bestimmt. Die Bestimmung der Enzymaktivität ist ausführlich bei Klose (109) beschrieben.

2.12.2.3 Bestimmung der Pyruvatkinase

Die Aktivität der Pyruvatkinase wurde mit dem UV-Test nach Bergmeyer und Bernt (9) bestimmt, wobei pro Testansatz nur halbe Mengen an Testreagentien eingesetzt wurden.

2.12.2.4 Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Die Bestimmung der Transaminasen wurde nach Bergmeyer und Bernt (9) durchgeführt. Pro Ansatz wurden für den UV-Test nur halbe Mengen der Testreagentien eingesetzt.

2.12.3 Proteinbestimmungen

Bei Proteinreinigungen wurde die Elution von Protein im Durchfluß bei 280 nm bestimmt.

Die Bestimmung von Protein für die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgte nach Lowry et al. (129).

Die Bestimmung von Protein für die Bestimmung von Aminosäuretransport-Aktivitäten, die aus 24-Trog-Kulturschalen mit niedrigem Proteingehalt erfolgte, wurde mit einer modifizierten Mikrobestimmung durchgeführt: Zu 25 µl in 0,33 N NaOH gelöstem Protein wurden 250 µl Lösung A (50 T 3% Na_2CO_3 +2T 1% $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ + 2T 2 % K-Na-tartrat) in einer Mikrotiterplatte zupipettiert. Nach 10 min. wurden 50 µl Lösung B (Folinreagenz) zupipettiert und nach einer Stunde bei Raumtemperatur die Absorption am ELISA-Reader bei 630 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge ist 410 nm. Als Standard wurde in NaOH gelöstes Rinderserumalbumin verwendet.

2.12.4 Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Elektrophoresen wurden als diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen nach der Methode von Laemmli (118) durchgeführt. Das Trenngel enthielt 10 %, das Sammelgel 3% Acrylamid. Pro Geltasche wurden 40-100 µg Protein aufgetragen. Für die Bestimmung von relativen Molekulargewichten wurden kommerziell erworbene Markerproteinmischungen als Vergleichsstandards verwendet: "LKB-Markers" (Cytochrom C 12,3 kd; Myoglobin 17,2 kd; Carboanhydrase 30 kd; Ovalbumin (hen egg) 45 kd; Albumin 66 kd; Ovotransferrin 76-78 kd); "Pharmacia-LMW-Kit" (Phosphorylase b 94 kd; Albumin 67 kd; Ovalbumin 43 kd; Carboanhydrase 30 kd; Trypsin Inhibitor 20,1 kd; α-Lactalbumin 14,4 kd). Die Stromstärke

für ein 12 cm Trenngel (1.5 mm) wurde bei 25 mA konstant gehalten. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blue G-250. Bei Elektrophoresen, die für Western-Blots eingesetzt wurden, wurde zum Teil ein durchgehender Kamm mit einer Tasche für Markerproteine verwendet. Präparative Elektrophoresen wurden in Gelen mit 3 mm Durchmesser durchgeführt. Die Quervernetzung des Polyacrylamids erfolgte zum Teil durch Verwendung von Bis-acrylcystamin (BAC), einem Disulfidbrücken enthaltenden Analogon von Bisacrylamid, das die vollständige Solubilisierung des Gels in monomere Ketten nach Reduktion mit 2-Mercaptoethanol erlauben sollte (7.5% total/4% BAC)(67). In Vorversuchen konnte jedoch trotz Erhöhung der Menge des reduzierenden 2-Mercaptoethanols keine Solubilisierung des Polyacrylamidgels erreicht werden. Weitere Vorversuche zur Solubilisierung, in denen die Polymerisationsbedingungen variiert wurden, führten ebenfalls nur zur teilweisen Solubilisierung des Gels. Native Elektrophoresen wurden ohne SDS mit dem Puffersystem nach Davis (28) durchgeführt.

2.12.5 Western-Blot-Technik

Der Transfer von durch Elektrophorese aufgetrennten Proteinen aus dem Gel auf Nitrocellulose (Western-Blotting) wurde im Prinzip nach der Methode von Towbin et al. (184) durchgeführt. Der Transfer erfolgte in einer Transphor-Elektroblot Einheit (LKB) für 14h bei 15° C und einer Stromstärke von 0.5 A. Die verwendete Nitrocellulose hatte einen Porendurchmesser von ca. 0.8 µm. Vor dem Zusammenbau des Transfersandwichs wurde das Gel kurz in Transferpuffer äquilibriert. Die Qualität des Transfers wurde durch Anfärben eines Nitrocellulosestreifens mit Amidoschwarz (2 min. Fär-

ben in 0,1% Amidoschwarz in 25% Isopropanol/10% Eisessig; 5 min. Entfärben in 25% Isopropanol/10% Eisessig) geprüft. Die Nitrocellulose wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen für 2-3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C in 4% Milchpulver oder Rinderserumalbumin in PBS (pH 7,5) inkubiert. Die Absättigung mit Milchpulver lieferte in der Regel einen geringeren Hintergrund als mit BSA, wobei allerdings generell eine etwas geringere Empfindlichkeit der Detektion zu beobachten war. Zur Inkubation (bei 4° C über Nacht) mit dem Antiserum wurde die Nitrocellulose in einzelne Streifen geschnitten und mit jeweils einem Milliliter der entsprechenden Antikörperverdünnung in Plastiksäckchen eingeschweißt. Die Antikörperlösung enthielt ebenfalls 4% Milchpulver. Die Identifizierung immunreaktiver Banden erfolgte mit Hilfe eines zweiten, mit Peroxidase konjugierten Antikörpers. Die Peroxidase-Reaktion wurde entweder mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (95) oder mit einer Mischung aus Diaminobenzidin und Aminotriazol (55) als Substrate durchgeführt. Die Inkubationsdauer in der Färbelösung betrug 0,5-2 min. Ein mit negativem Kontrollserum behandelter Streifen wurde jedesmal entsprechend inkubiert, um unspezifisch angefärbte Banden identifizieren zu können.

2.12.6 Immuntitration

2.12.6.1 Präzipitationstest mit Staphylococcus aureus

Die Bestimmung des Anti-Glutaminsynthetase-Antikörpergehalts verschiedener Serumchargen erfolgte hier durch Bindung von Glutaminsynthetase aus einem Leberhomogenat (1:100) an einen Antiglutaminsynthetase-Antikörper- Protein A-Komplex an der Zellwand von Staphylococcus aureus Cowan I.

Protein A in der Zellwand von Staphylococcus aureus Cowan I bindet mit hoher Affinität IgG-Moleküle. Der Test beruhte auf dem Verfahren von Kessler et al. (100). Die Herstellung der Staphylokokkensuspensionen und die Durchführung des Tests wird ausführlich bei Heini (69) beschrieben und wurde leicht modifiziert durchgeführt. 200 µl Serumverdünnung (1:1 - 1:16) wurden mit 100 µl Staphylokokken-Suspension im Überschuß versetzt und 30-45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Auswaschen wurde der gebildete Antikörper-Staphylokokken-Komplex mit 200 µl Homogenat (1:100) inkubiert (30 min., 37° C) und der Immunkomplex danach abzentrifugiert. Über die Abnahme der Glutaminsynthetase-Aktivität, die im Überstand bestimmt wurde, konnte auf den Gehalt an Antiglutaminsynthetase-Antikörpern in der jeweiligen Serumcharge geschlossen werden.

2.12.6.2 ELISA

Die Bestimmung des Antikörpergehalts verschiedener Antikörper- und Serumchargen wurde in 96-Trog-Mikrotiterplatten durchgeführt. Zur Detektion wurde eine gegen den ersten Antikörper gerichtete IgG-Fraktion verwendet, an die Peroxidasemoleküle gekoppelt waren. Die Nachweisreaktion erfolgte mit ABTS als Substrat. Die Durchführung der Antikörperinkubationen und der Substratreaktion ist ausführlich bei Schäfer-Degenhart (167) beschrieben.

2.12.6.2.1 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Glutaminsynthetase und Antigenen aus isolierten Membranfraktionen.

96-Trog-Mikrotiterplatten wurden mit ungefähr 5 µg Protein/Trog einer angereicherten GS-Fraktion in Kopplungspuffer, pH 9,6 beschichtet und mit 4% BSA in PBS

abgesättigt. Alle weiteren Lösungen zum Waschen und für die Verdünnung der Seren enthielten 0,1% BSA mit oder ohne Detergens (Tween 20, 0,01%).

Abweichend hiervon wurden die Platten zum Nachweis von Antikörpern gegen isolierte Membranfraktionen mit 5 µg Protein/Trog einer angereicherten Plasmamembranfraktion in 10 mM Imidazolpuffer, pH 7,4 beschichtet und diese dann in die Tröge eingetrocknet . Alle weiteren Lösungen enthielten 0,1-1% BSA und 10 mM Tris•Cl in isotonischer Saline-Lösung, pH 7,7. Zugabe von 0,02 % Tween 20 als Detergens hatte keinen Einfluß auf die Meßwerte.

2.12.6.2.2 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Zell assoziierte Antigene

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Antigene, die noch mit Zellen assoziiert waren, wurden isolierte Hepatozyten in 96-Trog-Kulturschalen abgesetzt. Die Bedingungen für das Absetzen und Kultivieren der Hepatozyten werden bei Schäfer-Degenhart (167) und in Abschnitt 2.7 beschrieben. Die 24 h alten Zellen wurden nach Abspülen des Kulturmediums mit 3.5 % Formaldehyd in PBS für 5 min. schwach fixiert, um die Zellmembran möglichst intakt zu erhalten. Da es allerdings unter diesen Fixationsbedingungen leicht zu einem Ablösen der Zellen während der vielen Waschgänge kam, wurden die Zellen später mit 0.1 % Glutardialdehyd/ 3.5 % Formaldehyd für 1 min. nachfixiert. Alle weiteren Schritte wurden wie bei Schäfer-Degenhart (167) beschrieben durchgeführt. Diese Platten konnten auch zum Nachweis und zur Titerbestimmung von Antikörpern gegen isolierte Membranfraktionen verwendet werden.

2.13 Aminosäuretransportmessungen

Zur Messung der Aufnahme von Aminosäuren in kultivierte Hepatozyten wurde die "Cluster-Tray-Methode" von Gazzola et al. (41), mit Modifikationen nach Gebhardt & Williams (55) verwendet. Als Inkubationsmedium für die Transportmessungen wurde stets mit einem Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer bei pH 7,4 gearbeitet. Zur Messung der Natrium-unabhängigen Aufnahmeraten wurde Natrium durch Cholin ersetzt. Vor Beginn der Inkubationen wurden die Kulturplatten mit vorgewärmter Saline gewaschen. Der Start der Transportmessungen erfolgte durch die gleichzeitige Zugabe des Transportmediums (200 µl) mit Hilfe von speziell angefertigten 24-Trog-Vorratsplatten in alle Tröge einer 24-Trog-Kulturplatte und die anschließende Inkubation der Platten im Brutschrank. Nach Ablauf der Transportzeit wurden die Platten dreimal durch Eintauchen in Töpfe mit eiskalter Saline gewaschen. Durch Zugabe von 400 µl 0,33 N NaOH wurden die Zellen aufgelöst (37° C, 2-3 h). 350 µl wurden für die Messung der Radiaktivität abgenommen und nach Zugabe von 4 ml Szintillator (Aqualuma Plus) die Radioaktivität gemessen.

Die Inkubation wurden jeweils in Natrium- und in Cholin-Medium durchgeführt. Der Natrium-abhängige Transport wurde als Differenz der Aufnahme, die in den einzelnen Medien bestimmt wurde, berechnet (50).

Im einzelnen wurden für die Messungen des Aminosäuretransports folgende Inkubationen durchgeführt:

System A: Transport über System A wurde mit 0,2 mM ^{14}C-α-Aminoisobuttersäure (AIB) (spez. Radioaktivität : 555 kBq/µMol) als Substrat jeweils mit und ohne 20 mM N-Methyl-AIB als spezifischem Inhibitor gemessen. Der durch N-Methyl-AIB hemmbare Natrium-abhängige Anteil wurde als

System A-spezifischer Transport berechnet.

System N: Transport über System N wurde in Gegenwart von 20 mM N-Methyl-AIB, um den Anteil von System A zu hemmen, gemessen. Als Substrat wurde 0,1 mM L-(2,5-^{3}H) Histidin (spez. Radioaktivität: 264 kBq/µMol) eingesetzt. Als spezifischer Transport wurde der nicht durch n-Methyl-AIB hemmbare Natrium-abhängige Anteil angesehen.

Glutamattransport: Der Transport von Glutamat wurde mit 0,1 mM L-(U-^{14}C) Glutamat (spez. Radioaktivität: 250 kBq/µMol) als Substrat gemessen. Die Aufnahme von Glutamat in seiner anionischen Form wurde als der Teil berechnet, der durch 20 mM Cysteat gehemmt werden konnte.

Die Inkubationszeit für die Aufnahmemessungen betrug jeweils 5 min. Für die Bestimmung kinetischer Konstanten (Glutamattransport) wurden die Glutamatkonzentration von 0,006 mM bis 6 mM variiert (21 Konzentrationen). Die Inkubationszeit wurde bei diesen Messungen auf 2 min. reduziert, um auch bei hohen extrazellulären Glutamatkonzentrationen eine lineare Aufnahme/Zeit-Abhängigkeit zu gewährleisten. Die Auswertung der Meßdaten zur Bestimmung kinetischer Parameter erfolgte mit dem Analyseprogramm "PENNZYME" (112) auf Mikrocomputern.

2.14 Immunhistochemische Verfahren

2.14.1 Fixierung und Kontrollfärbung

Für immunhistochemische Verfahren wurden Kryostatschnitte (10 µm) oder Paraffinschnitte (7 µm) von Lebergewebe hergestellt (52,46). Die Herstellung der Paraffin-

schnitte wurde dankenswert von den Mitarbeiterinnen des Labors von Herrn Prof. Dr. Pfeiffer am Institut für Hirnforschung der Universität übernommen. Die Fixierung des Gewebes erfolgte entweder vor dem Einbetten (Paraffinschnitte) oder nach dem Schneiden des Gewebes. Für Paraffinschnitte wurde entweder eine mit Saline blutfrei gespülte Leber mit 3,5 % Paraformaldehyd in PBS in situ perfundiert bis das Gewebe hart wurde und dann nach Herausschneiden und Zerkleinern der Leber für weitere 2-4 h nachfixiert oder die abgeschnittenen Leberstückchen wurden nur durch Inkubation in 3,5 % Paraformaldehyd in PBS für 3-5 h fixiert. Für die Herstellung von Kryostatschnitten wurde die blutfrei gespülte Leber in kleine Stückchen geschnitten und diese in mit flüssigem N_2-gekühltem Isopentan eingefroren. Die Leberstücke wurden danach in flüssigem N_2 aufbewahrt. Nach Herstellung der Schnitte (10 µm, -20° C) wurde das Gewebe in 3,5 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur nachfixiert und in PBS kalt gelagert.

Auf Deckgläschen kultivierte Hepatozyten wurden zur Vorbereitung für immunhistochemische Verfahren mit Saline abgespült und dann durch folgende Verfahren fixiert: (a) Fixierung mit 3,5 % Paraformaldehyd, Methanol und Aceton nach Hallermeyer et al. (64), nur mit 3,5 % Paraformaldehyd in PBS und Methanol (52) oder mit Dimethoxypropan (52). Alle Fixationsverfahren lieferten identische Färbungen.

Zur morphologischen Begutachtung von Leberschnitten wurden die Schnitte, nach eventuell notwendigem Entwachsen (Paraffinschnitte), in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (95, 85, 50, 30, 15 %) für 2 min mit Harris Haematoxilin-Lösung, die danach mit Aqua dest. ausgespült wurde. Nach weiteren 5 min Stehenlassen der Zellen in Aqua dest. wurden die übrigen Zellbestandteile mit einer 0,5%igen alkoholischen Eosinlösung angefärbt, die nach 1 min durch Auswaschen

mit absolutem Alkohol entfernt wurde. Anschließend konnten die Proben nach 2 min Inkubation in Xylol mit DePeX oder Eukitt direkt eingebettet werden.

2.14.2 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Glutaminsynthetase-positiven Zellen bzw. zur Lokalisierung der Antigene, die von den hergestellten poly- und monoklonalen Antikörpern erkannt werden, erfolgten entweder mit indirekter Immunfärbung mit einem Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörper oder nach einer Modifikation (48) der unmarkierten Antikörper-Peroxidase-Antiperoxidase-Methode von Sternberger (177):

Paraffinschnitte wurden durch Behandlung mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (95, 85, 50, 30, 15 %) entwachst und danach einer mindestens 30 minütigen Behandlung mit Methanol und 0.5% H_2O_2 unterworfen, um endogene Peroxidasen zu zerstören (46). Im weiteren wurden für die Färbung von Schnitten und Zellkulturen auf Deckgläschen prinzipiell folgende Schritte durchgeführt: (1) Absättigung mit normalem Ziegenserum (1:10 verdünnt in PBS), (2) Inkubation mit dem ersten Antikörper (Kaninchen-Anti-Glutaminsynthetase-Serum, 1:400-1:800; Anti-Membranseren, 1:100-1:200; Hybridoma-Kulturüberstände, unverdünnt; Aszitesflüssigkeit, 1:500-1:10000; alle Verdünnungen in PBS mit 5% normalem Ziegenserum.), (3) a) Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:40) bzw. b) Ziege-anti-Maus IgG (1:200) und nachfolgend löslicher a) Peroxidase(Kaninchen)-Antiperoxidase-Komplex (1:50) bzw.b) Peroxidase(Maus)-Antiperoxidase-Komplex (1:400).

Die Inkubationen wurden in einer feuchten Inkubationskammer für den ersten Antikörper über Nacht bei 4° C oder für 30 min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle weiteren Inkubationen dauerten 30 min. bei Raumtemperatur. Die je-

weils dazwischenliegenden Waschinkubationen in PBS dauerten 30 min mit zweimaligem Wechsel der Waschlösung. Die Sichtbarmachung der Peroxidase erfolgte durch eine Inkubation mit einer Diaminobenzidin (0.5 mg/ml)-Aminotriazol (2 mg/ml)-H_2O_2 (0.005%)-Mischung (55) in 100 mM Tris·Cl-Puffer, pH 7.6 für 10-15 min.

Die Co-Lokalisierung von Glutaminsynthetase und Carbamoylphosphat-Synthetase wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Charles in Amsterdam durchgeführt. Der Nachweis der Carbamoylphosphat-Synthetase erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum und der oben beschriebenen PAP-Technik mit 3-Amino-9-ethylcarbazol, das eine rote Farbe produziert (95), als Substrat. Für Glutaminsynthetase wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, der im Labor von Prof. Charles gegen die im Rahmen dieser Arbeit gereinigte Glutaminsynthetase aus Rattenleber hergestellt wurde. Die Nachweisreaktion erfolgte mit einem ß-Galaktosidase-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG und 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-galaktosid, das einen blauen Farbstoff bildet (12).

2.14.3 Einbettung der gefärbten Präparate

Immunperoxidaseschnitte wurden über eine aufsteigende Äthanolreihe (30, 50, 85, 99 %) entwässert, in Xylol getränkt und anschließend mit DePeX oder Eukitt eingebettet.

2.14.4 Elektronenmikroskopie (Immunogoldfärbung)

Die Elektronenmikroskopische Lokalisation der Antigene, die von den hergestellten polyklonalen Antiseren gegen isolierte Plasmamembranfraktionen markiert werden, erfolgte mit Hilfe einer Immunogoldmarkierung (156), die dankenswert von Dr. H. Robenek in Münster durchgeführt wurde.

2.15 Antikörper

2.15.1 Polyklonale Antiseren

2.15.1.1 Antiserum gegen Glutaminsynthetase

Die Markierung Glutaminsynthetase-haltiger Zellen erfolgte immunzytochemisch. Als Antikörper gegen Glutaminsynthetase wurde zu Beginn der Arbeit ein von Prof. Dr. B. Hamprecht zur Verfügung gestelltes Serum gegen Glutaminsynthetase aus Schweinehirn eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Antiserum gegen Glutaminsynthetase aus Rattenleber hergestellt, das dann ausschließlich verwendet wurde.

2.15.1.1.1 Immunisierung

Als Material zur Immunisierung eines Kaninchens wurde aufgereinigte Glutaminsynthetase aus Rattenleber (s. Abschn. 2.11) verwendet. 300 µg Protein der Fraktion der Cibacron-blue-Affinitätschromatographie mit der höchsten spezifischen Glutaminsynthetase-Aktivität wurde auf ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. Die Lage der Bande, die die Glutaminsynthetase-Untereinheit repräsentiert, wurde an Hand von mittels Coomassie-Brilliant-blue angefärbten Kontrollstreifen identifiziert. Die Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden zusammen mit komplettem Freund's Adjuvans in einem Potterhomogenisator zu einer dicken Suspension verarbeitet. Ein Milliliter dieser Suspension wurde einem Kaninchen an etwa zehn verschiedene Stellen am freirasierten Rücken subcutan injiziert. Nach vier Wochen wurde die gleiche Menge Antigen (1:1 in inkomplettem

Freund's Adjuvans) subcutan injiziert. Da nach mehreren Wochen noch keine Antikörper im Serum nachzuweisen waren (immunhistochemische Färbung), wurde das Kaninchen zuerst nach vier Wochen und dann im Abstand von 4 Monaten noch mehrfach mit jeweils 300 µg Protein der Fraktion der Affinitätschromatographie geboostert, die für die Erstimmunisierung verwendet wurde. Der präparative Elektrophoreseschritt wurde ab der dritten Injektion nicht mehr durchgeführt.

2.15.1.1.2 Serumgewinnung

Zur Gewinnung von Serum jeweils zweimal im Abstand von 8-10 Tagen nach den Boosterinjektionen wurde ein Ohr des Kaninchens zur Förderung der Durchblutung mit Xylol eingerieben. Die deutlich hervortretende Ohrvene wurde mit einer Kanüle punktiert und das Blut aufgefangen. Pro Blutabnahme wurden 20-40 ml Blut abgenommen. Zur besseren Gerinnung wurde das Blut 1 h bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4° C gelagert. Nach Zentrifugation (10 min., 3000 g) wurde das Serum abgenommen und bei -20° C gelagert.

2.15.1.1.3 Affinitätsadsorption zur Reinigung des Antiserums

Das erhaltene Antiserum wurde durch Adsorption in Schalen mit Hepatozytenkulturen aus CCl_4-vorbehandelten Ratten gereinigt. In CCl_4-Kulturen ist immunologisch praktisch kaum noch Glutaminsynthetaseaktivität nachweisbar. Verunreinigende Antikörper, deren Antigene nicht ausschließlich auf zerstörten Zellen der Zone 3 lokalisiert sind und damit nicht mehr präsent waren, adsorbieren an die Kulturen, während Antikörper gegen Glutaminsynthetase im Überstand bleiben. Die Adsorption wurde folgendermaßen durchgeführt: 8 ml einer 1:5 verdünnten Lösung des Antiglutaminsythetase-

Antiserums in PBS mit 5% normalem Ziegenserum wurden für 30 min. bei Raumtemperatur in einer Schale (100 mm) mit einer fixierten (3.5% Paraformaldehyd) CCl_4-Hepatozytenkultur, die mit 10% normalem Ziegenserum in PBS abgesättigt war, inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung abgenommen und in eine weitere Kulturschale gegeben. Die Inkubationsschritte wurden bis zu 10 mal mit immer frischen Kulturschalen wiederholt. Die Spezifität des Antiserums wurde vor und nach den Inkubationen durch Western-Blotanalyse überprüft.

2.15.1.2 Antiserum gegen Zytoplasmamembranen

Die Herstellung eines Antiserums gegen Antigene in Hepatozytenplasmamembranen verfolgte den Zweck, durch Adsorption der Antikörper an Glutaminsynthetase freien Zellkulturen ein Antiserum zu erhalten, das zur Identifizierung von möglicherweise heterogen im Acinus verteilten Oberflächenantigenen dienen konnte. Dazu wurden Plasmamembranfraktionen aus 48 h alten Hepatozytenkulturen, die in Gegenwart von 10^{-7} M Dexamethason kultiviert wurden, angereichert (s. Abschn. 2.10) und charakterisiert. Angereicherte Plasmamembranfraktionen (50 µg Protein) mit der höchsten 5'-Nukleotidase-Aktivität wurden einem Kaninchen mit komplettem Freund's Adjuvans (1:1) an mehreren Stellen am Rücken injiziert. Nach 2 Wochen wurde die gleiche Menge an Protein in inkomplettem Freund's Adjuvans (1:1) nachgespritzt und das Kaninchen im Abstand von 2 Wochen durch subcutane Injektion von 50 µg Protein in inkomplettem Freund's Adjuvans mehrfach geboostert. Jeweils 7-8 Tage nach der letzten Boosterinjektion wurde Blut abgenommen und der Antikörpertiter in einem ELISA gegen angereicherte Membranfraktionen getestet. Das Antiserum wurde weiter in immunhistochemischen

Verfahren und durch Western-Blotanalyse charakterisiert.

2.15.2 Monoklonale Antikörper

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Rattenhepatozyten erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Hixson & Allison (71):

Zuerst wurden mit einem Antiserum, das gegen periportale Hepatozyten hergestellt wurde, Antigene, die sowohl periportal als auch perivenös auf den Hepatozyten vorkommen, blockiert. Damit sollten die Zellen nur noch Antigene präsentieren können, die überwiegend auf perivenösen Hepatozyten vorkommen. Diese "Vorbehandlung" der Hepatozyten diente dem Zweck, die Produktion von Antikörpern gegen Antigene von perivenösen Zellen zu begünstigen bzw. gegen solche von periportalen Hepatozyten zu verringern. Im einzelnen wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

(1) Durch Immunisierung von Mäusen mit in 3,5% Paraformaldehyd fixierten Hepatozyten aus CCl_4-vorbehandelten Ratten wurde ein Antiserum hergestellt, das einen hohen Titer gegen diese Zellen aufwies. Die Immunisierung erfolgte durch 3-malige Injektion der Hepatozyten (1×10^6 Zellen in 400 µl PBS, i.p.) im Abstand von 7 Tagen. Nach 6 Tagen wurde nach Abschneiden der Schwanzspitze Blut entnommen (bis 200 µl) und Antikörper im Serum in einem ELISA gegen kultivierte Hepatozyten aus CCl_4-vorbehandelten Ratten in 96-Trog-Mikrotiterplatten nachgewiesen.

(2) Dieses Antiserum wurde mehrfach (4 mal im Abstand von 7 Tagen) in einer Menge, die zur Absättigung der doppelten Zahl der später injizierten Hepatozyten ausreichte, neuen Mäusen subcutan an mehreren Stellen im Rücken injiziert. Zur Immunisierung gegen perivenöse Hepatozyten erhielten diese

Mäuse anschließend 3-5 x 10^6 fixierte perivenöse Hepatozyten i.p. verabreicht, die zuvor mit einer optimalen Menge des in (1) hergestellten Anti-Hepatozyten-Antiserums abgesättigt worden waren. Die Immunisierung wurde 4 mal in wöchentlichem Abstand wiederholt. Drei Tage vor der geplanten Fusion mit den Myelomzellen wurde bei den verschiedenen Tieren der Titer in einem ELISA gegen 48 h kultivierte perivenöse und periportale Hepatozyten bestimmt und das Tier, dessen Serum die höchste Differenz aufwies, ausgewählt.

(3) Zur Fusion wurde der Myeloma-Stamm X 63-Ag8.653 (98) verwendet, der selbst keine eigenen Immunglobuline mehr synthetisiert, aber noch die Fähigkeit zu deren Sekretion besitzt. Die Präparation der Milzzellen der immunisierten Maus und die Fusion mit den Myelomazellen mit Hilfe von Polyäthylenglykol 1500 erfolgten in Anlehnung an das Scriptum "Hybridoma Techniques" des EMBO, SKMB Kurses 1980 in Basel. Die einzelnen Schritte sowie die Kultivierung der Hybridomzellen sind sehr ausführlich bei Heini (69) und Schäfer-Degenhart beschrieben (167) und werden deshalb hier nicht mehr im Detail aufgeführt. Die Zellsuspension mit den fusionierten Zellen wurde auf 500 Tröge in 24-Trog-Kulturplatten in 2 ml HAT-Medium verteilt. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37° C mit einem Gemisch aus 10% CO_2 und Luft inkubiert. Das Medium wurde zum erstenmal nach 3 Tagen gewechselt, im folgenden dann 2 mal pro Woche . Nach 14 Tagen wurde statt HAT-Medium nur noch HT-Medium verwendet. Alle Tröge in denen Hybridomzellen kultiviert wurden, enthielten stets etwa 10^5 peritoneale Makrophagen als Fütterzellen. Das Ergebnis der Fusion waren 412 Kulturtröge mit je 1-4 Klonen. Die abgenommenen Kulturüberstände dienten zum Test auf die Produktion von Antikörpern.

(4) Das Screening erfolgte zunächst in einem ELISA gegen kultivierte und anschließend fixierte periportale und perivenöse Hepatozyten, die mit der Digitonin/Kollagenase-Tech-

nik gewonnen wurden, in 96-Trog-Mikrotiterplatten (s. Abschn. 2.12.5.2). Da es wahrscheinlich auf Grund von zum Teil langen Lagerzeiten und einer möglicherweise zu schwachen Fixierung zu einer teilweisen Ablösung von Zellen vorwiegend in den Platten mit perivenösen Zellen kam, mußten die Zellen nachfixiert werden. Eine Aussage über das Auftreten von überwiegend perivenös bindenden Antikörpern war nicht mehr zweifelsfrei möglich. Der ELISA wurde deshalb nur als grobes Screnning für das Vorhandensein von Antikörpern gegen Hepatozyten eingesetzt. Auf diesem Weg wurden 123 sehr stark positiv reagierende Klone ausgewählt, die weiter kultiviert wurden. Die Überstände dieser Kulturen wurden direkt auf Leberschnitten in immunhistochemischen Färbungen getestet. Auf jeden Objektträger waren 4 Leberschnitte aufgebracht. Durch Abtrennen von einzelnen Arealen des Objektträgers mit je einem Schnitt mit Hilfe eines Klebstoffes konnten gleichzeitig 4 verschiedene Proben pro Objekträger eingesetzt werden; damit konnten die Kulturüberstände in einer kurzen Zeit durchgetestet werden. Die Schnitte wurden bis zu 6 mal für 30 min bei Raumtemperatur mit je 40 µl Kulturüberstand inkubiert. Zwei Klone, die Antikörper mit einer besonders interessanten heterogenen Zonierung zeigten (BG8-B1 und BG11-D6), wurden ausgewählt und zweimal in 96-Trog-Kulturschalen subkloniert.

(5) Zellen von zweimal subklonierten Hybridoma-Klonen, die eine positive Reaktion im Zell-ELISA und nach Massenproduktion der gepickten Klone in Kulturflaschen in der immunhistochemischen Färbereaktion aufzeigten, wurden zur Induktion eines Aszites in Mäuse überimpft. Das Induzieren des Aszites und die Propagation der Zellen in weitere Mäuse wird ausführlich bei Schäfer-Degenhart (167) beschrieben. Die gewonnenen Aszitesflüssigkeiten wurden nach Verdünnung (bis 1:10000) für die hier gezeigten immunhistochemischen Färbungen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Antiserum gegen Glutaminsynthetase aus Rattenleber

Durch seine strenge perivenöse Lokalisation in einem kleinen Bereich rund um die terminalen hepatischen Venen (52) ist Glutaminsynthetase ein hervorragendes Markerenzym für perivenöse Zellen. Die Anreicherung perivenöser Zellen in Hepatozytensubpopulationen kann über die Bestimmung der Enzymaktivität und durch Auszählen immunhistochemisch Glutaminsynthetase-positiver Zellen recht einfach bestimmt werden. Zur immunzytochemischen Markierung von Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten war es notwendig, ein spezifisches Antiserum gegen Glutaminsynthetase aus Rattenleber herzustellen.

3.1.1 Reinigung von Glutaminsynthetase

Für die Herstellung eines Antiserums gegen Glutaminsynthetase wurde, als Ausgangsmaterial für die Immunisierung, Glutaminsynthetase aus Rattenleber gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach einer Kombination der Reinigungsverfahren von Tate et al. (179), Ronzio et al. (158) und Jaenicke & Berson (84).

Die einzelnen Schritte der Reinigung sind in nachfolgender Reinigungstabelle zusammengefaßt:

Tabelle 1. Reinigung der Glutaminsynthetase aus Rattenleber

	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität (U)*	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)
Acetonpulver Extraktion	475.000	28.000	0,06	100
Säurefällung	54.100	28.000	0,52	98
Ammonsulfat-Fällung	2.250	22.000	9,60	77
Hydroxylapatit	331	12.100	36,60	43
DEAE-Sephacel	62	6.500	104,80	23
Cibacron Blue Sephadex G-75	23	3.400	147,00 ♭	12

* bestimmt mit dem -Glutamyltransferase Test (Abschnitt 2.12.2.1.3)

♭ Anreicherung ca. 588-fach (bezogen auf die durchschnittliche Homogenataktivität in Frischleber)

Als Ausgangsmaterial wurde aus gesammelten, gefrorenen Rattenlebern Acetonpulver hergestellt, das über längere Zeit gelagert werden kann. Die spezifische Aktivität im Acetonextrakt lag um etwa das vierfache niedriger als die durchschnittliche Aktivität im Leberhomogenat (0,25 ± 0,08 U/mg Prot.). Diese Differenz dürfte auf die zum Teil lange Lagerzeit des Gewebes bzw. auch auf irreversible Denaturierung eines Teils des Enyzmproteins auf Grund der Acetonbehandlung zurückzuführen sein. Die Säurefällung wurde nur bis zum pH 5,0 durchgeführt, da frühere Reinigungsversuche gezeigt hatten, daß die Reextraktion nach Ausfällung des Enzyms bei pH 4,3 mit großen Aktivitätsverlusten verbunden war. Während der Reinigung wurde die Enzymaktivität durch Bestimmung der γ-Glutamyltransferaseaktivität verfolgt. Die Aktivität des gereinigten Enzyms wurde zusätzlich durch Bestimmung der Synthetaseaktivität mit dem γ-Glutamylhydroxamattest und über die direkte Synthese von radioaktivem Glutamin bestimmt.

Das Enzym wurde 588-fach angereichert (bezogen auf die mittlere Aktivität in der Leber) mit einer Ausbeute von 12%. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms lag mit 147 mU/mg Prot. nur wenig unter den Werten, die von Deuel et al. (30) beschrieben wurden. Direkte Messung der Synthetaseaktivität der reinsten Fraktionen im Glutamylhydroxamattest ergab Werte (9-11 U/mg Prot.), die etwas über den Ergebnissen von Tate et al. (179) lagen. Die direkte Bestimmung der Enzymaktivität durch die Messung von aus ^{14}C-Glutamat synthetisiertem ^{14}C-Glutamin ergab eine spezifische Aktivität von 6 U/mg Protein, die mit den Ergebnissen von Tate et al. (179) übereinstimmte. Diese Ergebnisse zeigen, daß alle drei Testverfahren für die Bestimmung der Glutaminsynthetaseaktivität in angereicherten Enzympräparationen eingesetzt werden können. Die Reinheit des Proteins wurde

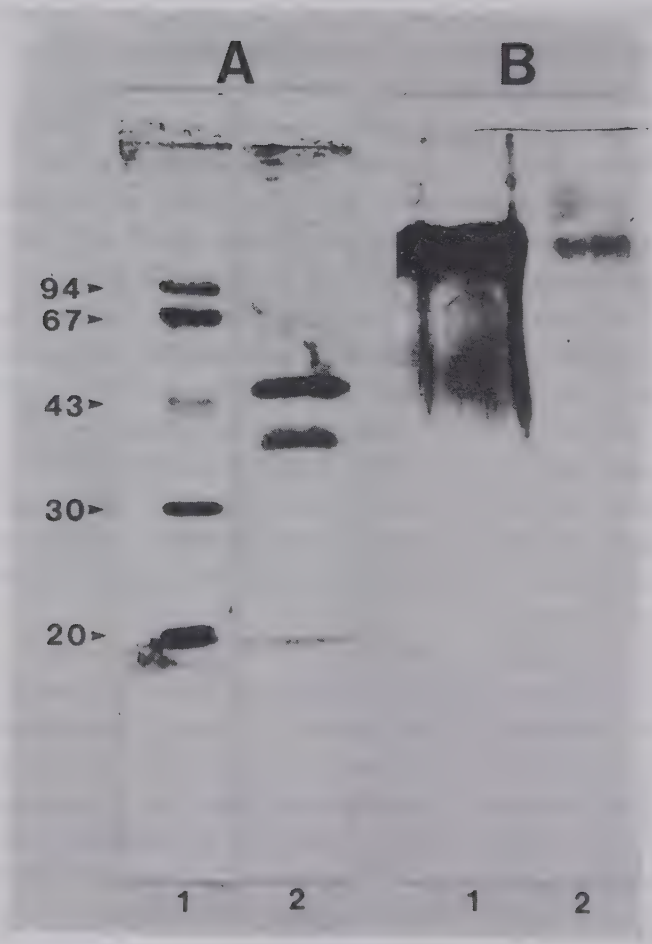


Abb. 1: Polyacrylamidgel-Elektrophoresen von aufgereinigter Glutaminsynthetase aus Rattenleber. A: 10%-SDS-Gel, Linie 1 Markerproteine: Phosphorylase S 94 kd, Albumin 67 kd, Ovalbumin 43 kd, Carbo-Anhydrase 30 kd. Linie 2 GS (Rattenleber) 10 µg. B: 7%-"natives" Gel, Linie 1 GS 120 µg, Linie 2 GS 30 µg.

durch Elektrophorese in einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel und in einer nativen Elektrophorese in einem 7%-Polyacrylamidgel überprüft. Das SDS-Gel (Abb. 1A) zeigt eine Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 44 kd, die verschmierte Bande darunter konnte im Westernblot als Degradationsprodukt identifiziert werden.Im nativen Gel (Abb. 1B) war außer einer kräftigen Bande eine zweite schwache Bande im höheren Molekulargewichtsbereich zu entdecken.

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung des Antiserums

3.1.2.1 Immunisierung und Serumgewinnung

Jeweils 300 µg Protein der Fraktion mit der höchsten spezifischen Glutaminsynthetaseaktivität wurden zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Das Enzym wurde vor der Immunisierung auf ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Bande, die die Enzymuntereinheiten enthielt (Lokalisierung über angefärbte Kontrollstreifen), wurde ausgeschnitten und zur Immunisierung verwendet. Da nach zweimaliger Injektion von Enzym/Polyacrylamid-Suspension im Abstand von vier Wochen in immunzytochemischen Färbungen keine spezifischen Antikörper gegen Glutaminsynthetase nachgewiesen werden konnten, wurde das Kaninchen nach weiteren vier Wochen noch zweimal im Abstand von vier Monaten geboostert. Für die Boosterinjektionen wurde das Enzymprotein ohne weitere elektrophoretische Aufreinigung injiziert. Eine Woche nach der 4. Immunisierung wurde das erste Antiserum abgenommen. Jeweils zweimal im Abstand von 8-10 Tagen nach den Injektionen wurden weitere Chargen Antiserum abgenommen.

3.1.2.2 Charakterisierung und Reinigung des Antiserums

Die Immuntitration im ELISA gegen gereinigte Glutaminsynthetasefraktionen (Abb. 2) und der Nachweis von Antikörpern mit Hilfe des Präzipitationstests mit Staphylococcus aureus (Tab. 2), zeigen, daß die erhaltenen Antiseren einen hohen Gehalt an Antikörpern gegen Glutaminsynthetase aufweisen. Im Westernblot markieren die Immunseren noch eine schwache Nebenbande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 64 kd. Durch Adsorption des Antiserums an Hepatozytenkulturen von CCl_4-vorbehandelten Ratten, die praktisch keine Glutaminsynthetase enthalten, konnte die verunreinigende Bande entfernt werden. Das gereinigte Antiserun zeigt im Westernblot gegen elektrophoretisch aufgetrenntes Lebervollhomogenat eine einzige Bande mit einem Molekulargewicht, das dem der (identischen) Untereinheiten gegen Glutaminsynthetase entspricht (Abb. 3).

Tabelle 2. Nachweis von Anti-Glutaminsynthetase-Antikörpern mit Hilfe des Präzipitationstests[a]

Antiserum (µl)	12.5	25	50	100	200
Charge	Restaktivität im Überstand (%)[b]				
AGS I	60	44	32	29	29
AGS II	7	4	4	4	3
AGS III	17	11	9	10	8

[a] bestimmt mit dem Präzipitationstest mit Staphylococcus aureus.

[b] bezogen auf die Glutaminsynthetase-Aktiviät in 200 µl Leberhomogenat (1:100 in 50 mM Imidazolpuffer, pH 6.8).

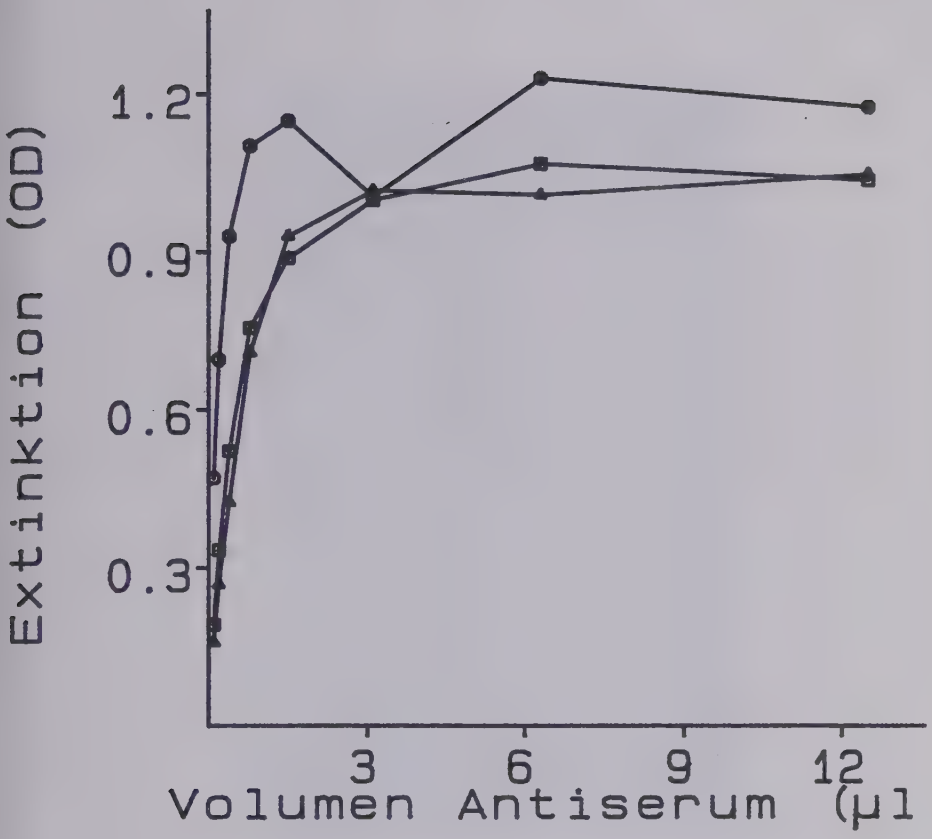


Abb. 2: Sättigungskurven von verschiedenen Anti-Glutaminsynthetase-Serumchargen gegen gereinigte GS-Enzympräparation (ELISA-Methode). Beschichtung mit 5 µg GS/Trog, Absättigung mit 4%BSA, 100 µl Antiserum-Verdünnung/Trog (1:8-1:1024 in PBS), 2. Antikörper: Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase konjugiert 1:1000 in PBS. Nachweisreaktion mit ABTS-Substratlösung 2 min. ◘ AGS I, ○ AGS II, ▲ AGS III. Die Extinktion wurde bei 410 nm gegen 490 nm als Referenzwellenlänge gemessen.

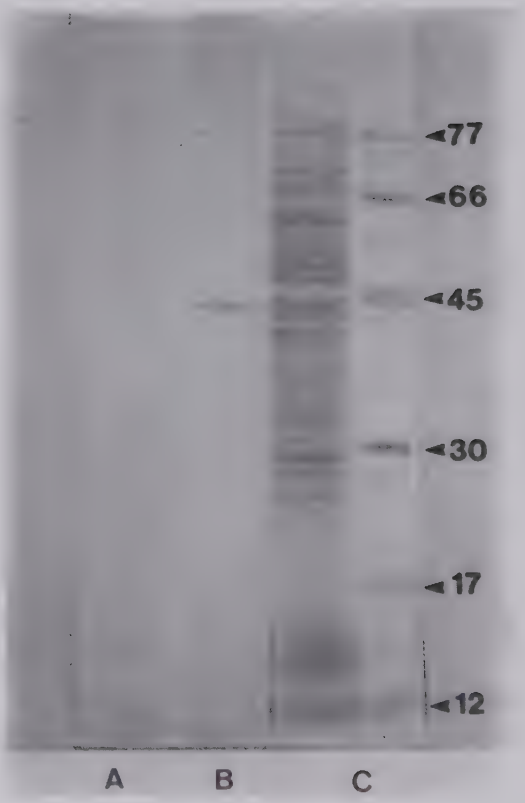


Abb. 3: Western Blot Analyse des Antiserums gegen Glutaminsynthetase aus Rattenleber. A) Präimmunserum 1:100 in PBS, B) Kaninchen-Antiserum aus Rattenleber 1:100 in PBS, C) Bandenmuster eines Lebervollhomogenats und Markerproteine der SDS-Disk-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

3.2 Heterogenität im normalen Leberparenchym

3.2.1 Lokalisierung von Glutaminsynthetase

Das gereinigte Antiserum wurde zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten von fixierten Leberstückchen mit der indirekten Peroxidase-Antiperoxidase-(PAP)-Methode eingesetzt. Glutaminsynthetase wurde in einer kleinen Population perivenöser Zellen gefunden (Abb. 4 E). Diese Zellen umrundeten die terminalen hepatischen Venen direkt anschließend an das Endothel und erstreckten sich häufig noch auf 1-2 weitere Zellreihen. Diese heterogene Lokalisation der Glutaminsynthetase stimmte genau mit Ergebnissen von Gebhardt & Mecke (52) überein, die erstmals die strenge heterogene Verteilung der Glutaminsynthetase in Immunfluoreszenzuntersuchungen mit einem Antiserum gegen Glutaminsynthetase aus Schweinehirn gezeigt hatten. Zu Vergleichszwecken ist eine solche Färbung in Abb. 4 A-D gezeigt. Kontrollversuche mit Präimmunserum zeigten stets keine Färbung. Das Antiserum gegen Glutaminsynthetase aus Schweinehirn wurde zum Teil zu Kontrollzwecken eingesetzt. In keinem Fall konnte ein Unterschied bei den Färbungen zwischen den beiden Antiseren festgestellt werden.

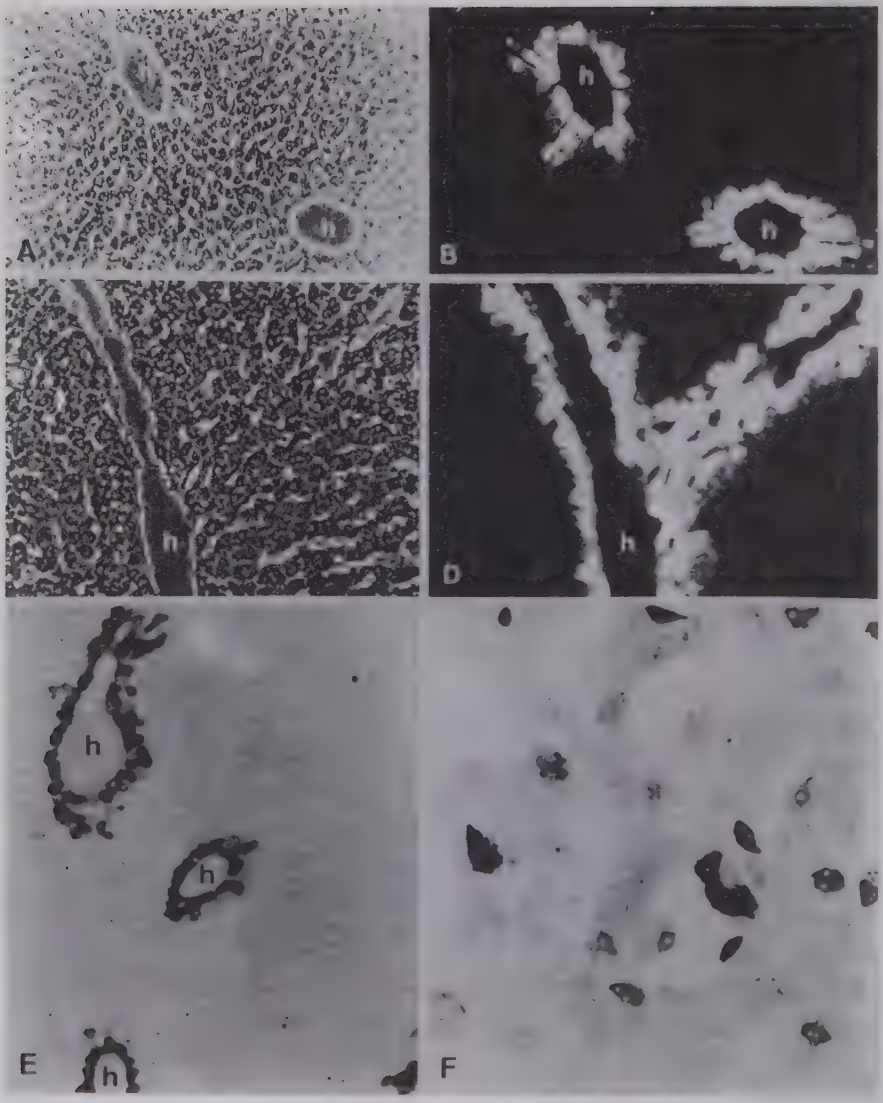


Abb. 4: Immunhistochemische Lokalisierung der Glutaminsynthetase in der Rattenleber und in kultivierten Hepatozyten.
A,B: Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzaufnahme eines Gefrierschnitts nach indirekter Immunfluoreszenzanfärbung auf Glutaminsynthetase (GS) mit Antiserum gegen das Schweinehirnenzym. Fluoreszenz ist nur in wenigen Zellen um die terminalen hepatischen Venolen (h) zu sehen. C,D: Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzaufnahme mit einem tangential geschnittenen efferenten Gefäß.
E: Paraffinschnitt mit Färbung auf Glutaminsynthetase mittels dem hergestellten Antiserum gegen das Rattenleberenzym und Peroxidase-Antiperoxidase-Technik. (h hepatische Venole), F: PAP-Färbung gegen Rattenleber-GS auf einer Hepatozytenkultur nach 24 h Kultivierung. A,B,E: x 150; C,D: x 210; F: x 160

3.3 Heterogenität von Hepatozyten in der Primärkultur

3.3.1 Immunzytochemische Anfärbung von Glutaminsynthetase

Von Gebhardt & Mecke (52) wurde gezeigt, daß die heterogene Verteilung der Glutaminsynthetase während der enzymatischen Dissoziation und der anschließenden Kultivierung der Hepatozyten erhalten bleibt. Auch das hergestellte Antiserum markiert beim immunzytochemischen Nachweis von Glutaminsynthetase deutlich einzelne Glutaminsynthetase-positive Zellen (Abb. 4 F). Die Häufigkeit der gefärbten Zellen entsprach etwa dem, was nach immunhistochemischer Färbung im Leberschnitt zu erwarten war und stimmte mit Werten von etwa 8% mit den Ergebnissen, die nach Immunfluoreszenzmarkierung von Gebhardt & Mecke erhalten wurden (52), völlig überein. Kontrollversuche mit Präimmunserum zeigten auch nach Isolierung und Kultivierung der Hepatozyten keine Färbung.

Damit ist die immunzytochemische Markierung von Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten ein einfach durchzuführendes Mittel, um zusätzlich zu der Bestimmung der Enzymaktivität die Häufigkeit von Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten in isolierten und kultivierten Hepatozytenpräparationen eindeutig zu bestimmen.

3.4 Trennung von perivenösen und periportalen Hepatozyten

Die Heterogenität des Leberparenchyms wurde inzwischen für eine ganze Reihe von metabolischen Funktionen beschrieben (94,92,91). Insbesondere ist die Heterogenität im Glutaminmetabolismus wegen der extremen und bisher einmaligen Verteilung der Glutaminsynthetase von besonderem Interesse. Zur Aufklärung von Fragen im Zusammenhang mit der Heterogenität im Glutaminmetabolismus war es wünschenswert, angereicherte Subpopulationen von perivenösen und periportalen Hepatozyten zu untersuchen.

In der Vergangenheit war die Auftrennung von Hepatozyten nach ihrer spezifischen Dichte als eine der geeignetsten Methode vorgeschlagen worden, um Zellpopulationen zu erhalten, in denen Hepatozyten aus dem periportalen und aus dem perivenösen Bereich des Acinus angereichert sein sollten (8). Mit der Verwendung von Glutaminsynthetase als Markerenzym war es möglich, der Frage nachzugehen, in wieweit eine Auftrennung von Hepatozyten aus einer Gesamtsuspension auf Grund unterschiedlicher Dichte der Zellen zur Anreicherung von perivenösen bzw. periportalen Hepatozyten dienen kann (Abschnitt 3.4.1).

Parallel dazu wurde versucht, durch eine Vorbehandlung von Ratten mit CCl_4 eine selektive Zerstörung der Zellen in Zone 3 zu erreichen, um so eine Zellpopulation zu erhalten, die hauptsächlich frei von Glutaminsynthetase-positiven Zellen war und überwiegend aus Zellen von Zone 1 und 2 bestand. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben.

Durch die Entwicklung der Digitonin/Kollagenase-Technik durch Quistorff (147) und Lindros & Penttilä (126) ergab sich dazu im Lauf der Anfertigung dieser Arbeit eine vielversprechende Alternative. Ergebnisse, die mit dieser Technik erhalten wurden, werden in Abschnitt 3.4.3 aufgeführt.

3.4.1 Auftrennung von Hepatozyten mittels Dichtegradienten

Für die Auftrennung von isolierten Hepatozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden (a) normale Hepatozyten, (b) Hepatozyten von einer mit Allylformiat vorgeschädigten Ratte und (c) perivenöse Hepatozyten, isoliert mit der Digitonin/Kollagenase-Methode, verwendet. Die Ergebnisse, die mit den Zellen aus vorbehandelter Leber bzw. nach periportaler Digitonininfusion erhalten wurden, sollen im Vorgriff auf Abschnitt 3.4.2.1 bzw. 3.4.3 bereits hier gezeigt werden. Die bei diesen Präparationen erhaltenen Zellen waren hinsichtlich ihrer acinären Herkunft eindeutig charakterisiert.

Die Zellen wurden direkt nach dem Kollagenaseverdau und den darauffolgenden Waschschritten auf die Gradienten pipettiert. Abb. 5 zeigt die Auftrennung der vitalen Hepatozyten verschiedener Präparationen in einem isoosmotischen Percoll®-Dichtegradienten. Ungefähr 80% der aufgetragenen Zellen wurden nach der Zentrifugation und den nachfolgenden Waschschritten wiedergefunden. Die runde Form der Zellen unterschied sich nicht von der Form der Zellen vor der Zentrifugation. Die Zellen der normalen Präparation und die perivenösen Zellen aus der Digitoninpräparation verteilen sich in einer einzigen breiten 'schweren' Bande mit einer

Dichte von 1,07 bis 1,11 g/cm³ mit einem Peak bei einer Dichte von etwa 1,08-1,09 g/cm³. Dieser Befund steht im Kontrast zu der Vermutung, daß perivenöse Zellen eine andere durchschnittliche Dichteverteilung aufweisen als Zellen aus dem periportalen Areal (125).

Die Auftrennung der Hepatozyten aus einer mit Allylformiat geschädigten Leber resultiert in einer 'schweren' Bande, die leicht hin zu höheren Dichten (1,085-1,13 g/cm³), mit einem Maximum bei einer Dichte von 1,10 g/cm³, verschoben ist. Eine adaptive oder regulatorische Beeinflußung der Zellen auf Grund der Vorbehandlung, die möglicherweise zu einer Veränderung der durchschnittlichen Dichte der Hepatozyten führt, kann nicht ausgeschlossen werden. Der Vitalitätsindex der Hepatozyten in dieser Bande betrug bei allen Präparationen über 95%. Eine zweite schmalere 'leichte' Bande fand sich bei allen Präparationen bei einer Dichte von 1,03-1,05 g/cm³. Der Vitalitätsindex der Zellen in dieser Bande lag unter 20%. In diesen 'leichten' Fraktionen waren damit überwiegend die Zellen konzentriert, die durch die Vorbehandlung oder die Beanspruchung während der Isolierung geschädigt worden waren.

Da die Dichteverteilung der Zellen der unterschiedlichen Präparationen gleichartig war, wurden die aufgetrennten Zellfraktionen der 'schweren' Bande zur besseren quantitativen Auswertung in vier Dichtepopulationen mit von Fraktion A nach D abnehmender Dichte zusammengefaßt (Abb 5 A). Die mittlere Proteinkonzentration zeigte mit Werten von 1,5-1,7 mg Protein/10^6 Zellen in allen Fraktionen bei allen Zellpopulationen keine bemerkenswerten Unterschiede. Die spezifischen Aktivitäten von Glutaminsynthetase, von Glutamat-Pyruvat-Transaminase und von Pyruvatkinase in den einzelnen Dichtepopulationen (A-D) der 'schweren' Bande wurden als Marker für den intraacinären Ursprung der Zellen gemessen. Die spezifischen Enzymaktivitäten, die innerhalb der

einzelnen Präparationen einer Zellpopulation starke Schwankungen zeigten, wurden, zum Vergleich der Zellpopulationen untereinander, relativ zur aufaddierten Gesamtaktivität aus den einzelnen Populationen Fraktionen berechnet und sind in Abb. 6 dargestellt.

Bei normalen Hepatozyten von unbehandelten Tieren zeigen die Aktivitäten von Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Pyruvatkinase keine signifikanten Unterschiede von Population A zu Population D. Die spezifische Aktivität der Glutaminsynthetase hingegen nimmt von Population A nach Population D deutlich zu (Verhältnis D:A 1,88).

Bei aufgetrennten Hepatozyten aus mit Allylformiat vorbehandelten Ratten nimmt die Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase von Population D hin zu Population B deutlich zu, während die weitere Zunahme hin zu Population A nicht so ausgeprägt ist. Die Aktivität der Pyruvatkinase nimmt von Population A nach Population C schwach zu. Die Aktiviät in Population D liegt wieder tiefer. Für Glutaminsynthetase findet man eine deutlich höhere Aktivität in den Populationen B,C und D als in Population A (Verhältnis D:A 2,1).

Die perivenösen Hepatozyten zeigen nach Zentrifugation nur für Glutaminsynthetase eine schwache Zunahme von Population A nach D (Verhältnis D:A 1,6). Die Aktivitäten der anderen Enzyme zeigen starke Schwankungen und weisen keinen deutlichen Gradienten zwischen den Populationen auf.

Damit findet man nur für die Glutaminsynthetase einen Unterschied der Aktivität in allen Präparationen, während die anderen Enzyme stark schwankende Aktiviäten in den einzelnen Fraktionen zeigen. Da diese Enzyme nur schwache Gradienten im Acinus aufweisen, könnten bereits geringe Schwankungen der Aktivität in einzelnen Präparationen, die durch Auslaufen der Enzyme oder rasche adaptive Reaktionen während der Isolierungsprozeduren auftreten, zu Problemen

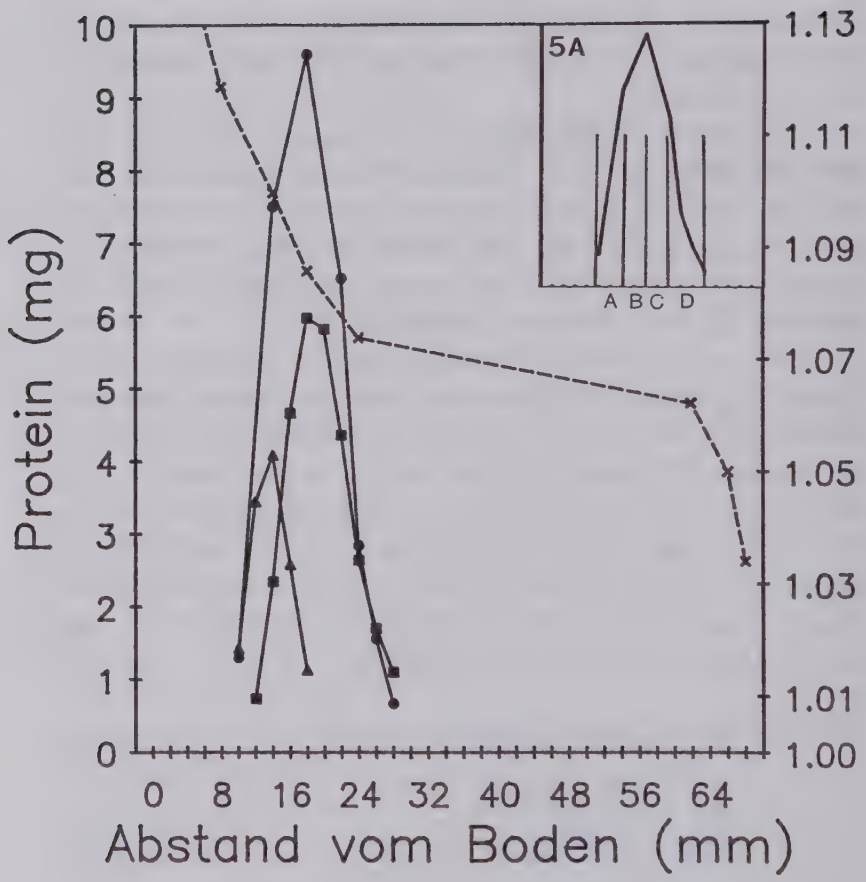


Abb. 5: Auftrennung von isolierten Hepatozyten mittels Gleichgewichtsdichte-Zentrifugation in einem vorgeformten Percoll-dichtegradienten. x--x Dichteprofil der verwendeten Gradienten. ● Hepatozyten aus normalen Tieren, ▲ Hepatozyten aus mit Allylformiat vorbehandelten Tieren. ■ perivenöse Hepatozyten, isoliert mit der Digitonin/Kollagenase-Technik.
Abb. 5A: Zusammenfassung der aufgetrennten Fraktionen in vier Dichtepopulationen A-D.

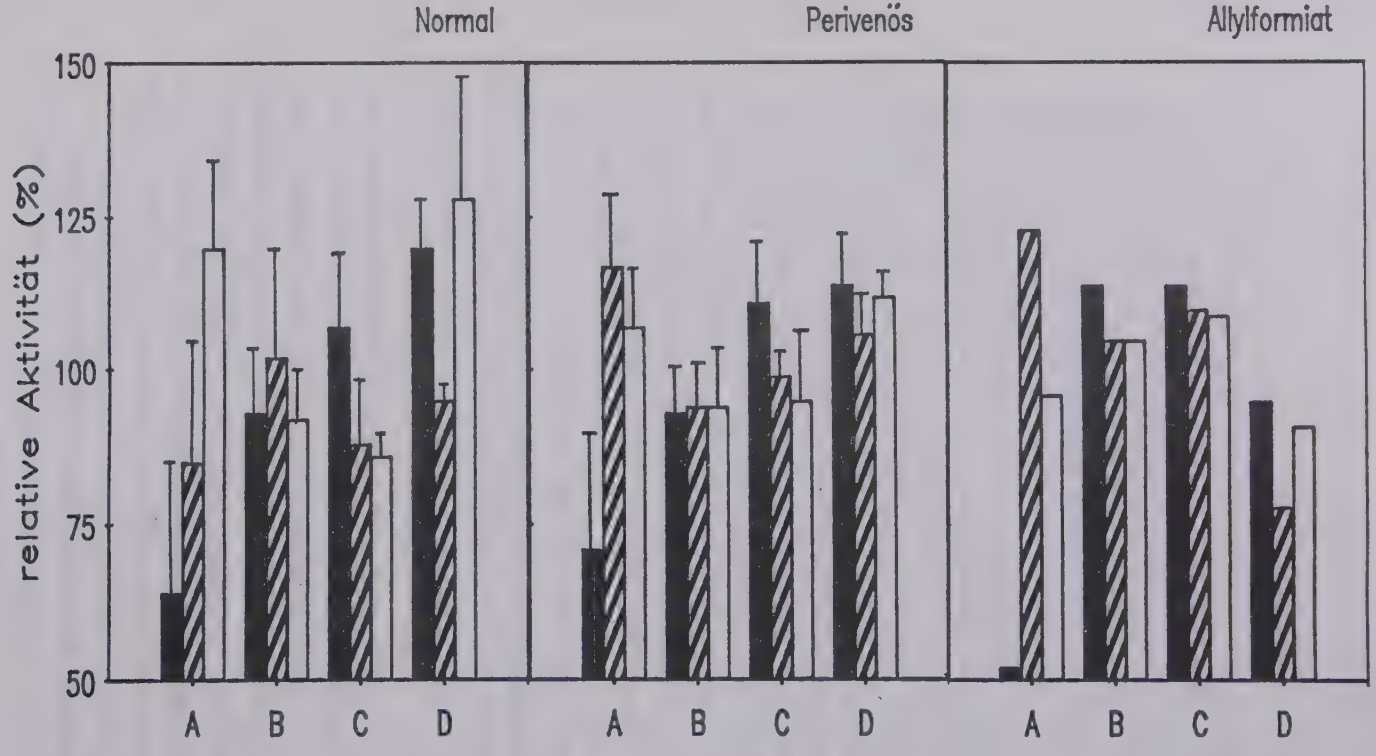


Abb. 6: Enzymatische Charakterisierung von mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennten Hepatozyten. Die Enzymaktivitäten sind als relative Aktivitäten bezogen auf die mittlere spezifische Aktivität pro mg Protein, die nach Aufaddition aller Fraktionen berechnet wurde. Die Zellfraktionen wurden in je vier Dichtepopulationen mit von A-D abnehmender Dichte zusammengefaßt. Gesamtzellsuspension: Mittelwerte aus 3 Präparationen ± SD; Perivenös: perivenöse Zellen, die mit der Digitonin/Kollagenase-Technik erhalten wurden, Mittelwerte aus 3 Präparationen ± SD, Allylformiat: Hepatozyten aus 3 Tage mit Allylformiat (25µl/kg) vorbehandelten Tieren, Mittelwerte aus 2 Präparationen. ■ Glutaminsynthetase, ▨ Glutamat-Pyruvat-Transaminase, □ Pyruvatkinase.

bei der Verwendung als Markerenzymen führen.

Diese Befunde zeigen, daß die perivenösen Zellen keiner spezifischen Dichtepopulation zuzuordnen sind, sondern die gleiche Dichteverteilung wie bei einer Gesamtzellsuspension aufweisen. Innerhalb der einzelnen Präparationsarten scheinen die Zellen mit der höchsten Glutaminsynthetaseaktivität in den Fraktionen mit einer etwas geringeren Dichte angereichert zu sein. Die Ergebnisse, die mit Zellen aus vorbehandelten Tieren erhalten wurden, sollten auf Grund der Vorbehandlung vorsichtig bewertet werden.

3.4.2 Experimentelle Schädigung des Leberparenchyms

Für verschiedene Lebertoxische Substanzen war eine selektive Schädigung einzelner Bereich des Acinus beschrieben worden (198). Zwei verschiedene experimentelle Modelle sollten benutzt werden, um unterschiedliche Zellpopulationen im Hinblick auf ihre acinäre Herkunft zu erhalten. Ausgewählt wurden hierzu Allylformiat, das bevorzugt das periportale Areal schädigt (151), sowie Tetrachlorkohlenstoff, der eine Schädigung im perivenösen Bereich (139) bewirkt. Durch Variation vor allem der Dosis bei Allylformiat und der Dauer der Behandlung bei CCl_4-Intoxikation wurden Bedingungen gesucht, die zum einen eine maximale selektive Schädigung hervorrufen und zum anderen aus dem noch intakten Teil die Isolierung vitaler Hepatozyten erlauben würden. Neben der morphologischen Begutachtung und der immunhistochemischen Lokalisierung der Glutaminsynthetase im Lebergewebe wurden auch die Veränderungen in der spezifischen Aktivität verschiedener Enzyme bestimmt, um den Grad der aufgetretenen Schäden genauer zu charakterisieren.

3.4.2.1 Schädigung mit Allylformiat

Bereits eine Kurzzeitbehandlung der Leber mit Allylformiat ruft eine deutliche Schädigung der Leber hervor (47,44). Die Aktivitäten der Transaminasen GPT und GOT, die überwiegend periportal lokalisiert sind, sind jedoch unter diesen Bedingungen noch nicht erhöht (47). Dosen über 150 µl/kg Allylformiat überleben die Ratten nur für kurze Zeit (<24 h)(47,44). Um ein längeres Überleben der Ratten zu erreichen, wurden die Ratten für eine längere Zeit (3 d) täglich, dafür aber mit niedrigeren Dosen (5-50 µl/kg) Allylformiat behandelt. Eine Schädigung der Leber war unter diesen Bedingungen nur bei der höchsten Dosis zu erkennen. Dies ist auch an Hand der Serumspiegel der GPT und der GOT festzustellen, die in Tab. 3 dargestellt sind und deutlich niedriger liegen als nach Kurzzeitbehandlung (47,44).

Eine deutliche Erniedrigung des vorwiegend periportal lokalisierten Markerenzyms GPT konnte erst bei einer Dosis von 50 µl/kg erreicht werden, bei der auch bereits die Aktivität der Glutaminsynthetase signifikant reduziert war (Tab 4). Die Aktivität der Pyruvatkinase, eines anderen perivenösen Markerenzyms, blieb unverändert. Dies wird auch durch die immunhistologischen Ergebnisse bestätigt, die bei Langzeitbehandlung (3d) bei einer Dosis von 50 µl/kg Allylformiat eine leichte Reduzierung der Glutaminsynthetase-positiven Fläche zeigte (Abb. 7). Obwohl keine Zeichen von Zellnekrosen in diesem Areal gefunden wurden, bestand der Glutaminsynthetase-positive Bereich nur noch aus einer einzelnen Zellreihe, die direkt am Endothel der terminalen hepatischen Venen angrenzte.

Diese Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß die toxische Wirkung des Allylformiats unter diesen Bedingungen, die das Überleben der Ratten für mindestens 3 Tage erlauben, bereits auf den perivenösen Bereich des Acinus durchschlägt.

Tabelle 3 . Serumspiegel von GPT und GOT nach 3-tägiger Vorbehandlung mit Allylformiat

Behandlung	Dosis (µl/kg)	Enzymaktivität (mU/ml)	
		GOT	GPT
Kontrolle	-	41 ± 17 (6)*	20 ± 3 (10)
Allyl-formiat	25	36 (2)	25 ± 4 (3)
	50	64 (2)	31 (2)

* Mittelwerte ± SD; Anzahl der Tiere in Klammern

Tabelle 4: Dosis-abhängige Veränderungen hepatischer Enzymspiegel bei Ratten nach Langzeitbehandlung mit Allylformiat[a]

Enzym	Spezifische Aktivität (U/g Leber)				
	Allylformiat-Dosis (µl/kg)				
	0	5	10	25	50
GS[b]	50,0 ± 7,3(6)	60,4 ± 15,1(5)	60,4 ± 3,6(5)	44,9 ± 9,2(5)	30,0 ± 6,8(4)
GOT	122,0 ± 25,7(4)	152,0 ± 63,9(3)	135,0 ± 26,5(3)	116,3 ± 79,2(3)	117,0 ± 35,4(2)
GPT	42,2 ± 13,2(6)	45,8 ± 19,6(5)	49,8 ± 10,8(5)	42,0 ± 27,3(5)	25,5 ± 6,2(4)
PK	13,6 ± 4,1(4)	16,0 ± 5,6(3)	13,7 ± 1,5(3)	15,7 ± 2,1(3)	14,3 ± 3,0(3)

[a] Die Behandlung erfolgte für 3 Tage mit der angegebenen Dosis. Messung der Werte 24 h nach der letzten Injektion.
[b] bestimmt mit dem γ-Glutamyltransferasetest (Abschnitt 2.12.2.1.3)
[c] Mittelwerte ± SD (Anzahl der Bestimmungen in Klammern).

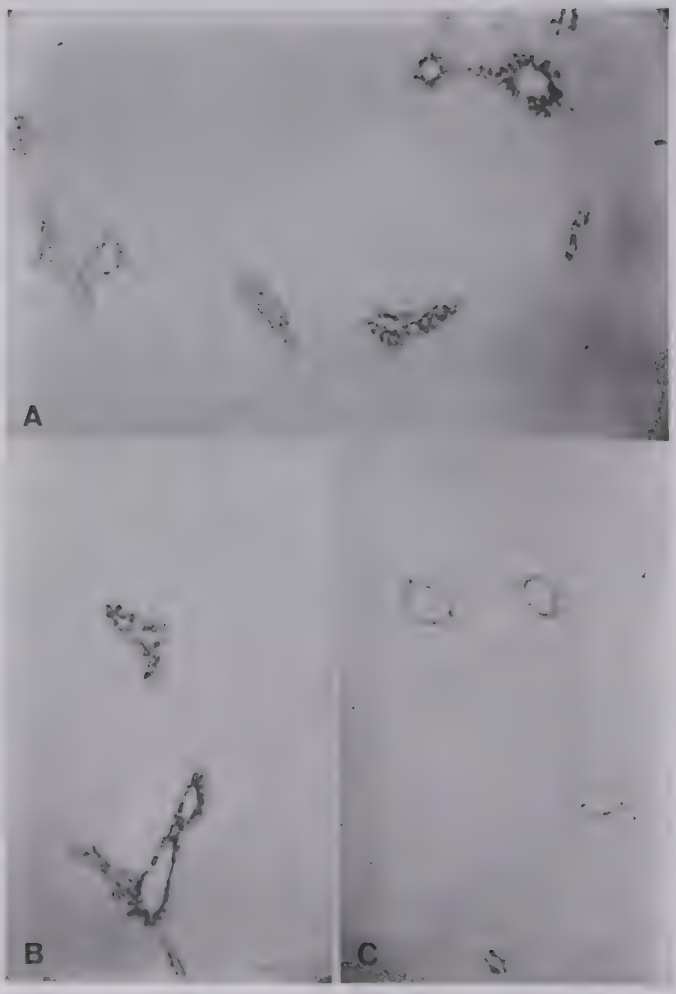


Abb. 7: Immunhistochemische Lokalisierung der Glutaminsynthetase in Rattenleber nach 3-tägiger Allylformiat-Behandlung. A) Leberschnitt einer Kontrollratte, B) Leberschnitt nach Behandlung mit Allylformiat, 3 Tage, 10 µl/kg. Das GS-positive Areal (PAP-Färbung) ist praktisch nicht beeinträchtigt. C) Leberschnitt nach Behandlung mit Allylformiat, 3 Tage, 50 µl/kg. Das GS-positive Areal (PAP-Färbung) ist deutlich verkleinert. A, B, C x 60.

3.4.2.2 Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff

CCl_4 verursacht selektiv Nekrosen in Zone 3 (139). Dies ist verbunden mit einer Verringerung der Aktivität der Glutaminsynthetase (47,52) und einer Abnahme der Glutaminsynthese (75). Für die Behandlung mit CCl_4 ließ sich eine Dosis- und vor allem Intoxikationsdauer-abhängige Abnahme der Glutaminsynthetase-Aktiviät beobachten (47,52). Bereits nach 24 h Behandlung mit CCl_4 (1000 µl/kg) ist in immunhistochemischen Versuchen eine vollständige Zerstörung des Glutaminsynthetase-positiven Areals offensichtlich. Jedoch deutet eine schwache, diffus verteilte Restfärbung in diesem Areal auf Zellreste hin, die immer noch immunologisch reagierendes Material enthalten (47,44). Wenn die Behandlungsdauer auf 3 Tage ausgedehnt wurde, kam es zu einem fast vollständigen Verschwinden von Glutaminsynthetase in vielen Acini (Abb. 9 A,B). Nur noch ganz vereinzelt sind Enzympositive Zellen direkt neben dem Endothel der Venolen zu sehen. Die immunhistochemischen Befunde werden durch Bestimmung der Enzymaktivität bestätigt.

3.4.2.2.1 Kultivierung von Hepatozyten aus Lebern von mit CCl_4 vorbehandelten Ratten

Aus Ratten, die für 3 Tage mit CCl_4 behandelt worden waren, wurden mit der normalen Präparationsmethode Hepatozyten isoliert. Diese Zellen hatten nach Anfärbung mit Trypanblau im Vergleich mit Hepatozyten aus unbehandelten Ratten (>90%) nur eine Vitalität von 70-80%. Zu Beginn hatten die Zellen viele Blebs und enthielten in Übereinstimmung mit der Steatose, die in histologischen Schnitten zu sehen war, eine große Anzahl von Fettröpfchen (Abb. 8A). Trotz einer großen

Tabelle 5.[a] Aktivität der Glutaminsynthetase nach Intoxikation mit CCl_4.

Behandlung[b]	Aktivität der Glutaminsynthetase[c]	
	mU/ mg Protein	mU/ g Leber
Kontrolle	395 ± 70 (7)	51,5 ± 8,2 (7)
CCl_4	85 ± 43 (7)	10,3 ± 5.1 (10)[d]

[a] eigene Werte und Werte von Gebhardt nach (46) zusammengefaßt.

[b] Dreimalige Injektion i.p. 1ml/kg in Öl im Abstand von je einem Tag.

[c] bestimmt mit dem γ-Glutamyltransferasetest (Abschnitt 2.12.2.1.3)

[d] Kontrolle/CCl_4, $P < 0.001$.

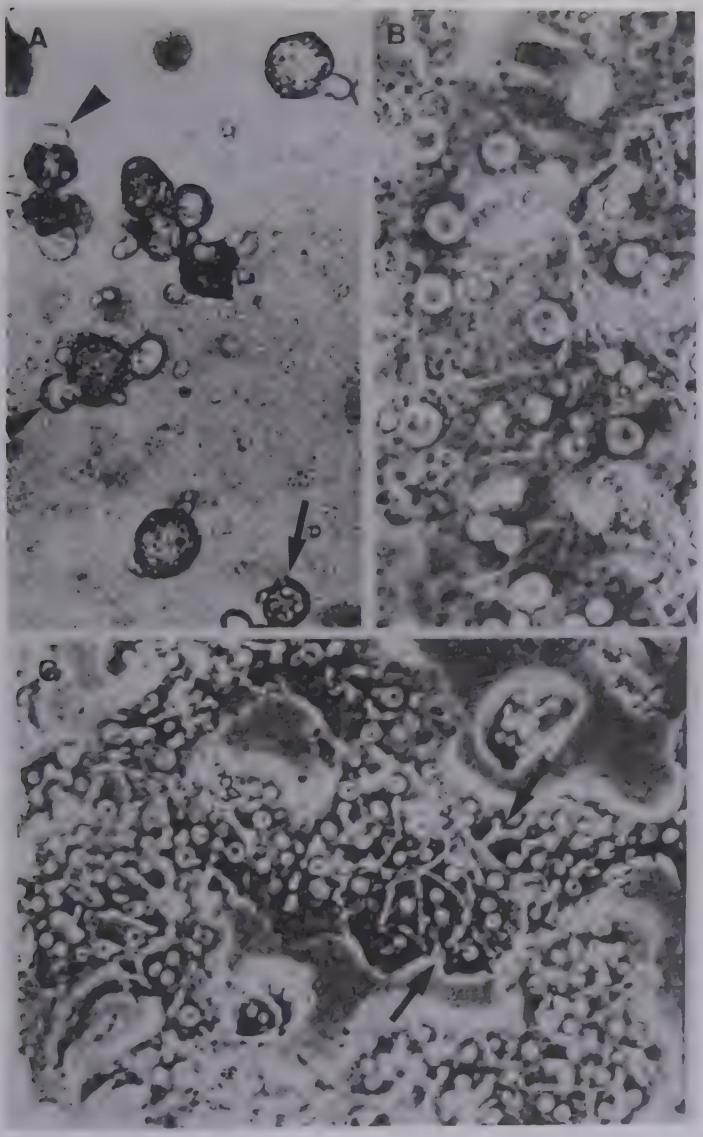


Abb. 8: Morphologie von isolierten und kultivierten Hepatozyten von CCl_4-behandelten Ratten. A) Isolierte Hepatozyten von einer 3 Tage mit CCl_4-behandelten Ratte. Die Zellen zeigen Fetttröpfchen (Pfeil), Blebs (Pfeilköpfe) und färben häufig mit Trypanblau an. B) Kultur von Zellen aus A nach einem Tag. C) Gleiche Kultur wie in B nach 3 Tagen. Die Zellen haben ihre Fetttröpfchen verloren und neue Gallekanälchen gebildet (Pfeile). A x 525; B, C x 435.

^Ähnlichkeit in Aussehen und Vitalität der ursprünglichen Zellsuspensionen paßten sich die Hepatozyten abhängig von der Dauer der CCl_4-Behandlung sehr unterschiedlich an die Kulturbedingungen an. Während die meisten der isolierten Hepatozyten aus Ratten mit 1-tägiger Vorbehandlung nach 24 h nicht mehr vital waren (Trypanblau-positiv) und der Rest den dritten Kulturtag praktisch nicht überlebte (46,44), bildeten isolierte Hepatozyten aus Ratten mit 3 Tage dauernder Vorbehandlung eine ausgezeichnete Monolayer mit nur wenigen daraufliegenden runden Zellen. Die Zellen bildeten, wie normale Zellen, wieder Gallekanälchen aus und verloren ihre Blebs und die Fettröpfchen innerhalb von 48 h. Nach 2-3 Tagen waren diese Kulturen mit morphologischen Kriterien praktisch kaum mehr von Hepatozytenkulturen aus unbehandelten Ratten zu unterscheiden (Abb. 8C).

Wie weiter oben bereits in vivo gezeigt wurde, führt die CCl_4-Behandlung zu einem Verschwinden der Glutaminsynthetase-haltigen Zellen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden enthielten Zellsuspensionen, die aus CCl_4-vorbehandelten Ratten isoliert wurden, eine drastisch reduzierte Aktivität von Glutaminsynthetase (Tab. 5). Dies zeigt sich auch nach immunzytochemischer Färbung der Zellen in einer verschwindend geringen Anzahl an Glutaminsynthetase-positiven Zellen (Abb. 9 C,D). Damit boten sich diese Kulturen als Modellsystem für Untersuchungen von Funktionen von Hepatozyten speziell in Zone 1 und 2 an. Diese Kulturen werden im folgenden als CCl_4-Kulturen bezeichnet.

Im Rahmen anderer Arbeiten (46) wurden durch Messungen einer Reihe von Funktionen, wie Harnstoffsynthese, Glucoseproduktion und Glutaminsynthese zum einen, die gute Integrität und Vitalität der Zellen belegt, zum anderen durch Vergleich mit Ergebnissen, die in Normalkulturen erhalten wurden, der gute Modellcharakter der Kulturen herausgestellt.

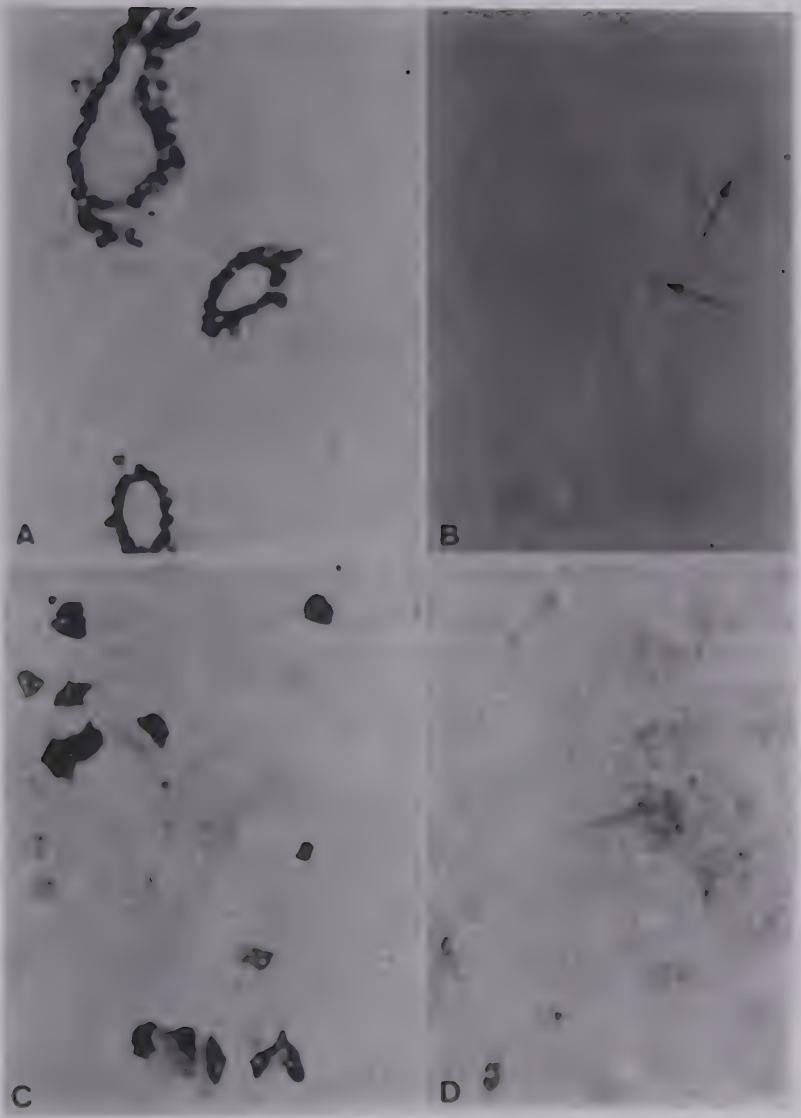


Abb. 9: Immunhistochemische und -zytochemische Lokalisierung der Glutaminsynthetase in Paraffinschnitten bzw. Kulturen von normalen und CCl_4-vorbehandelten Ratten.
A) Mittels PAP-Technik angefärbter Leberschnitt einer Kontrollratte. B) wie A nach 3 tägiger Behandlung mit CCl_4. Es sind nur noch ganz vereinzelt (Pfeile) GS-positive Hepatozyten mit der PAP-Färbung nachweisbar. C) Normale Zellkultur nach 24 h. D) CCl_4-Kultur nach 24 h. Die Zellen wurden 24 h nach der letzten Injektion isoliert. A, B x 150; C, D x 160

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Ergebnisse zur hormonellen Induzierbarkeit des Aminosäuretransports vorgestellt werden.

Aus Abb. 10 ist ersichtlich, daß die basale Aufnahmerate von α-Aminoisobutyrat über System A in den CCl_4-Kulturen um etwa 30-40% höher liegt als in den Kontrollkulturen. Die qualitative Antwort auf die Induktion mit verschiedenen Hormonen ist ebenfalls ähnlich. Während Dexamethason keinen Einfluß auf die Aufnahme von 0,2 mM α-Aminoisobutyrat hat, zeigt die Kombination von Dexamethason und Glucagon einen 7-fachen Anstieg der Aufnahmeraten in beiden Kulturen.

Im Gegensatz hierzu ergaben sich deutliche Unterschiede in der Induktion des spezifischen Natrium-abhängigen Transportsystems für Glutamat (Abb. 10). Mit Dexamethason, das in der Normalkultur das am stärksten stimulierende Hormon mit eine Steigerung der Aufnahme von 0,1 mM Glutamat um das über 20-fache ist, erhält man in den CCl_4-Kulturen nicht einmal eine 3-fache Steigerung der Aufnahmerate.

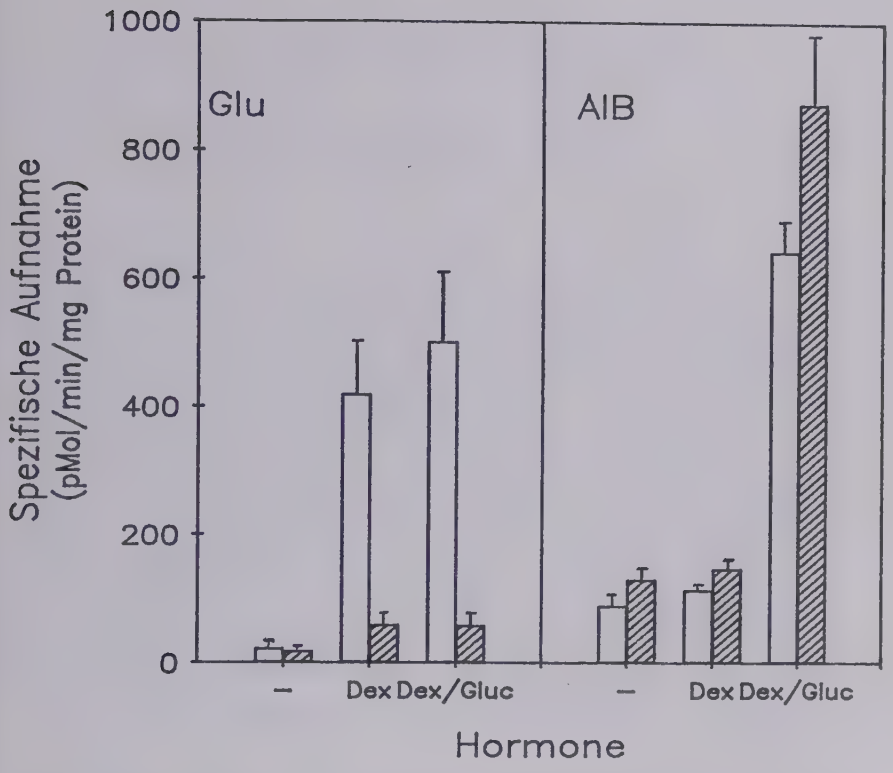


Abb. 10: Hormonelle Stimulation des Transports von Glutamat (Glu) und α-Aminoisobutyrat (AIB) in kultivierten Hepatozyten von normalen und CCl_4-vorbehandelten Ratten. Die Tiere wurden 3 Tage mit CCl_4 (1 ml/kg) behandelt. Die isolierten Hepatozyten von vorbehandelten (schraffierte Balken) und von normalen (offene Balken) Ratten wurden ohne Hormone (–), mit Dexamethason (Dex) oder mit Dexamethason und Glucagon (Dex/Gluc) für 30 h (AIB-Transport) bzw. 44 h (Glutamat-Transport) in MEM kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte 24 h nach dem Absetzen. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von 3 Kulturen. Abbildung nach (46) aus eigenen Versuchen und nach Gebhardt (44).

3.4.3 Digitonin/Kollagenase-Methode

3.4.3.1 Charakterisierung der Zellpopulationen

Die Digitonin/Kollagenase-Methode (147,126) ist auf die Isolierung der Hepatozyten direkt aus den entsprechenden acinären Zonen ausgerichtet. Eine kurze Infusion einer Digitoninlösung in die Leber zerstört selektiv die Hepatozyten, die in dem zuerst durchströmten Bereich liegen. Nach dem Herauswaschen des Digitonins in der jeweiligen Gegenrichtung werden die Hepatozyten aus dem unzerstörten Teil mittels Kollagenaseverdau isoliert. Abb. 11 zeigt einen mit Hämatoxilin/Eosin gefärbten Leberschnitt nach periportaler Digitonininfusion für 60 sec. Die geschädigten periportalen Areale sind u.a. an der Zerstörung der Gefäßepithelien und der Auflösung der geordneten Bälkchenstruktur deutlich zu erkennen.

Die Vitalität der erhaltenen Zellsuspensionen wurde durch Ausschluß von Trypanblau geschätzt und lag mit Werten von 80% normalerweise etwas niedriger als bei normalen Hepatozytenpräparationen (90%). Deshalb wurden die Zellsuspensionen zur Abtrennung von nicht vitalen Hepatozyten in allen Experimenten für eine kurze Zeit (1 h) kultiviert. Vitale Hepatozyten heften sich stark an die Kollagenmatrix in den Kulturschalen, während nicht lebensfähige Trypanblaupositive Zellen im Überstand bleiben und zum Großteil beim ersten Mediumwechsel abgesaugt werden können. Bei längerer Kulturdauer können sich außerdem nicht-vitale Zellen normalerweise nicht an die Kulturbedingungen adaptieren und werden so eliminiert. Im Rahmen einzelner Versuche (Kultur in 96-Trog-Platten) wurden geschädigte Zellen vor dem Absetzen

durch Zentrifugation in einem Percollstufengradient abgetrennt, da sich hier auch nicht-vitale Hepatozyten schon kurz nach dem Absetzen recht stark anhefteten.

Aus Abb. 12, die eine immunzytochemische Färbung auf Glutaminsynthetase von periportalen und perivenösen Zellen nach 24 h Kultivierung zeigt, ist eine effektive Trennung der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten deutlich zu ersehen. Die Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten sind in den perivenösen Fraktionen um das zwei- bis dreifache (bis 25 %) angereichert, während in den periportalen Fraktionen praktisch keine Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten zu sehen sind. Anders ausgedrückt bedeutet das den Verlust der Hälfte bis zu zwei Dritteln der Glutaminsynthetase-negativen Hepatozyten in den perivenösen Fraktionen, das heißt von Zellen aus der Zone 1 und 2. Die erfolgreiche Trennung wurde zusätzlich durch die Messung der Aktivität der Glutaminsynthetase bestätigt. Für Glutaminsynthetase wurde ein perivenös/periportales Verhältnis von 58 (Tab. 6) berechnet, das die Werte, die mit anderen bevorzugt perivenös lokalisierten Enzymen erhalten wurden, bei weitem übertrifft. Die zusätzlichen Messungen der Aktivitäten der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Tab. 6) bestätigen ebenfalls eine gute Trennung (perivenös:periportal 0,64), während die Bestimmung der Pyruvatkinase in den Subpopulationen ein perivenös:periportales-Verhältnis von nur 1,04 ergibt.

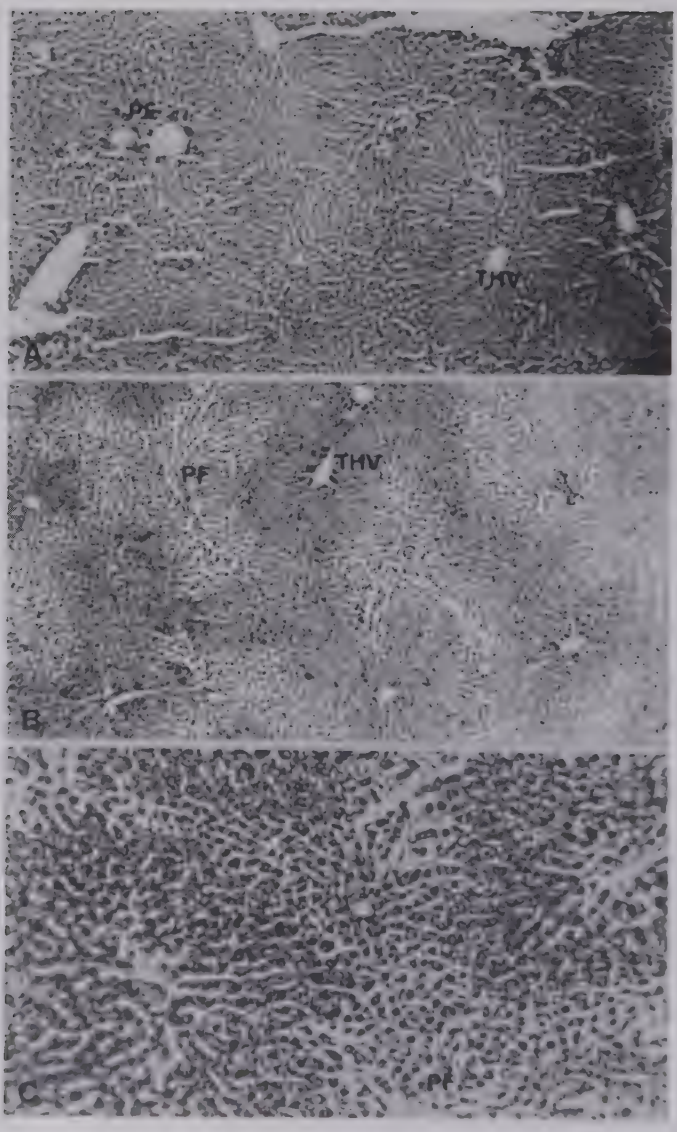


Abb. 11: Leberschnitte von normalen und mit Digitonin perfundierten Ratten. Die Schnitte wurden zur besseren Kontrastierung mit Haematoxylin/Eosin angefärbt. A) Paraffinschnitt einer Kontrolleber. PF Portalfeld, THV Terminale hepatische Vene. B,C) Paraffinschnitt einer Rattenleber, in die nach dem Herausspülen vom Blut für 75 Sek. Digitonin (7 mM) über die Pfortader infundiert wurde und dann sofort in der Gegenrichtung wieder herausgewaschen wurde. Anschließend wurde die Leber mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert. Man erkennt deutlich die stark aufgelockerte Zellbälkchenstruktur. Nur Bereiche um die terminalen hepatischen Venolen zeigen die gleiche dichte Struktur wie in der Kontrolleber. A x150 B x 80; C x 210.

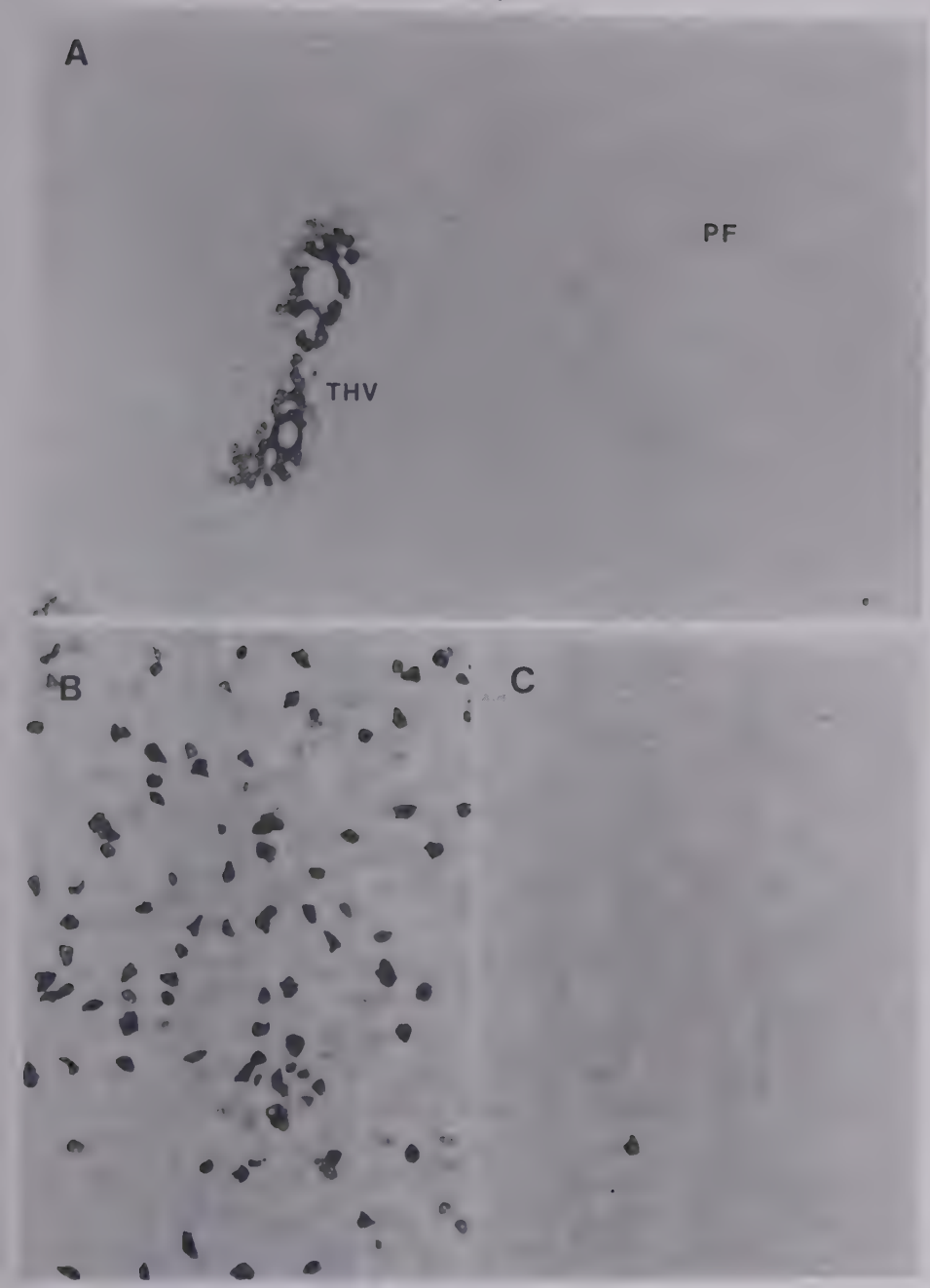


Abb. 12: Immunhistochemische Lokalisation von Glutaminsynthetase im Leberschnitt und in kulitivierten periportalen und perivenösen Hepatozyten. A) Paraffinschnitt (PAP-Färbung) einer Kontrolleber. THV terminale hepatische Venole, PF Portalfeld.B) perivenose Hepatozyten (PAP-Farbung) nach 24 h. C) periportale Hepatozyten (PAP-Farbung) nach 24 h. A x 42; B,C x 145.

Tabelle 6: Enzymatische Charakterisierung von perivenösen und periportalen Hepatozytensubpopulationen, die mit der Digitonin/Kollagenase-Technik isoliert wurden.

Marker Enzym	Periportal (PP)		Perivenös (PV)		
	Spezifische Aktivität[a]	Zell/Leber Verhältnis	Spezifische Aktivität	Zell/Leber Verhältnis	PV/PP Verhältnis
Alanin Amino transferase	327 ± 132 (19)	1,31 ± 0,25	229 ± 130 (24)	0,84 ± 0,18	0,64
Pyruvat kinase	142 ± 75 (9)	0,95 ± 0,24	197 ± 101 (17)	1,04 ± 0,27	1,09
Glutamin Synthetase[b]	12 ± 7 (13)	0,03 ± 0,02	617 ± 180 (25)	1,77 ± 0,40	59

[a] Alle Aktivitäten sind in nMol/min/mg Protein angegeben und stellen Mittelwerte ± SD aus der in Klammern angegebenen Anzahl von Bestimmungen dar.

[b] bestimmt mit dem γ-Glutamyltransferase Test (s. Abschn. 2.12.2.1.3)

3.4.3.2 Co-Lokalisierung von Glutaminsynthetase und Carbamoylphosphat-Synthetase in isolierten Zellen.

Ähnliche immunhistochemische Studien, wie diejenigen zur Lokalisierung der Glutaminsynthetase, wurden im Labor von Prof. Dr. R. Charles in Amsterdam mit Antiseren gegen die Carbamoylphosphat-Synthetase durchgeführt. Dieses Enzym zeigt in diesen Untersuchungen eine Verteilung im Acinus, die mit der der Glutaminsynthetase komplementär zu sein schien (39). Diese Ergebnisse schienen auch durch Doppelfärbungen gegen Glutaminsynthtase und Carbamoylphosphat-Synthetase in Leberschnitten, die in Zusammenarbeit von Dr. R. Gebhardt und der Gruppe um Dr. Charles durchgeführt wurden (44), bestätigt zu werden.

Mit den perivenösen Zellpräparationen war es möglich geworden, genauere quantitative Aussagen zur Lokalisierung dieser Enzyme zu machen. Um zu untersuchen, ob die Verteilung der beiden Enzyme streng komplimentär oder zum Teil überlappend ist, wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Gruppe in Amsterdam eine Doppelfärbung an isolierten perivenösen Zellen durchgeführt. In Abb. 13 ist eine perivenöse Zellsuspension zu sehen, die immunzytochemisch mittels einem monoklonalen Antikörper gegen Glutaminsynthetase und einem polyklonalen Kaninchenserum gegen Carbamoylphosphat-Synthetase gefärbt wurde. In einigen Zellen ist deutlich eine Doppelfärbung erkennbar, während andere ausschließlich mit Antikörpern gegen das eine oder das andere Enzym reagierten. In Tab. 7 ist die Häufigkeit der Hepatozyten aufgeführt, in denen in Gesamtzellsuspensionen und in perivenösen Subfraktionen die einzelnen Enzyme getrennt oder zusammen markiert werden konnten. Daraus ergibt sich, daß ca. 4 % der Leberparenchymzellen, d.h. ungefähr 50% der Glutaminsynthetase-positiven Zellen beide Enzyme gleichzeitig enthalten.

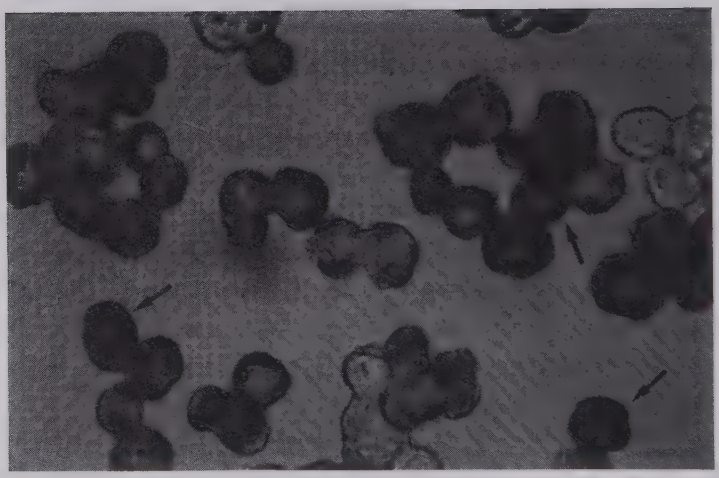


Abb. 13: Co-Lokalisierung von Glutaminsynthetase und Carbamoylphosphat-Synthetase in isolierten perivenösen Hepatozyten. Die Co-Lokalisierung wurde mit einem polyklonalen Antiserum gegen Carbamoylphosphat-Synthetase (PAP-Technik, rotbraun) und monoklonalen Antikörpern gegen Glutaminsynthetase (indirekte ß-Galaktosidase-Technik, blau) durchgeführt. Drei deutlich doppelmarkierte Zellen sind durch Pfeile hervorgehoben. x 400 (In Zusammenarbeit mit Jan Willem Gaasbeek Janzen, Amsterdam)

Tabelle 7.[a] Relative Häufigkeit von Hepatozyten mit CPS, GS oder beiden Enzymen in Gesamtzellsuspensionen und perivenösen Subfraktionen

Zellpräparation	Relative Anzahl (%)		
	CPS+[b]	GS+[b]	CPS+/GS+
Gesamtsusp.	95 ± 0,5[c]	8 ± 0,6	4 ± 0,7
Perivenös[c]	89 ± 1,8	22 ± 0,7	11 ± 0,4

[a] Die Daten wurden von Dr. R.Gebhardt zusammengestellt (44) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

[b] Immunzytochemische Färbung von Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS) und Glutaminsynthetase (GS) wie Abb. 13

[c] Mittelwerte ± SD von 3 Zählungen a 50 -150 Zellen

[d] Isoliert mit der Digitonin/Kollagenase-Methode (147,126).

3.4.3.3 Heterogenität des Aminosäuretransports

Im Zusammenhang mit der Heterogenität des Glutamin- und Ammoniakstoffwechsels stand die Untersuchung einer möglichen Heterogenität des Aminosäuretransports und dessen möglicherweise unterschiedliche hormonelle Regulation im Vordergrund des Interesses. Zur Bestimmung der Aufnahmeraten von α-Aminoisobutyrat (AIB), von Histidin und von Glutamat in den periportalen und perivenösen Subpopulationen wurden die Zellen zuerst kurz unter Kulturbedingungen inkubiert, damit sich die vitalen Hepatozyten an die Kollagenmatrix in den Kulturschalen anheften konnten. Die Aufnahme wurde danach genau 1 h nach dem Absetzen der Zellen bestimmt. Da zur Messung der Natrium-abhängigen Aufnahme notwendigerweise auch immer der Natrium-unabhängige Anteil bestimmt werden mußte, konnten auch Aussagen über den Natrium-unabhängigen Transport gemacht werden, ohne daß dabei die Aufnahmen bestimmten Transportsystemen zugeordnet wurden.

In Abb. 14 A werden die Natrium-unabhängigen Aufnahmeraten in perivenösen, periportalen und normalen Leberzellpräparationen miteinander verglichen. Eine Heterogenität zwischen den periportalen und den perivenösen Hepatozyten wurde nur für die Aufnahme von Histidin gefunden. Diese wird durch eine deutlich höhere Aufnahme in die perivenösen Zellen charakterisiert. Für die Aufnahme von AIB und von Glutamat hingegen wurden keine Unterschiede zwischen den Populationen nachgewiesen.

Durch die Berücksichtigung der Kompetition mit spezifischen Inhibitoren kann die Natrium-abhängige Aufnahme der verwendeten Substrate den Systemen A,N und G^- zugeordnet werden. Diese zeigte ein anderes Verteilungsmuster besonders für System N und G^- (Abb. 14 B). Die Aufnahme von Glutamat

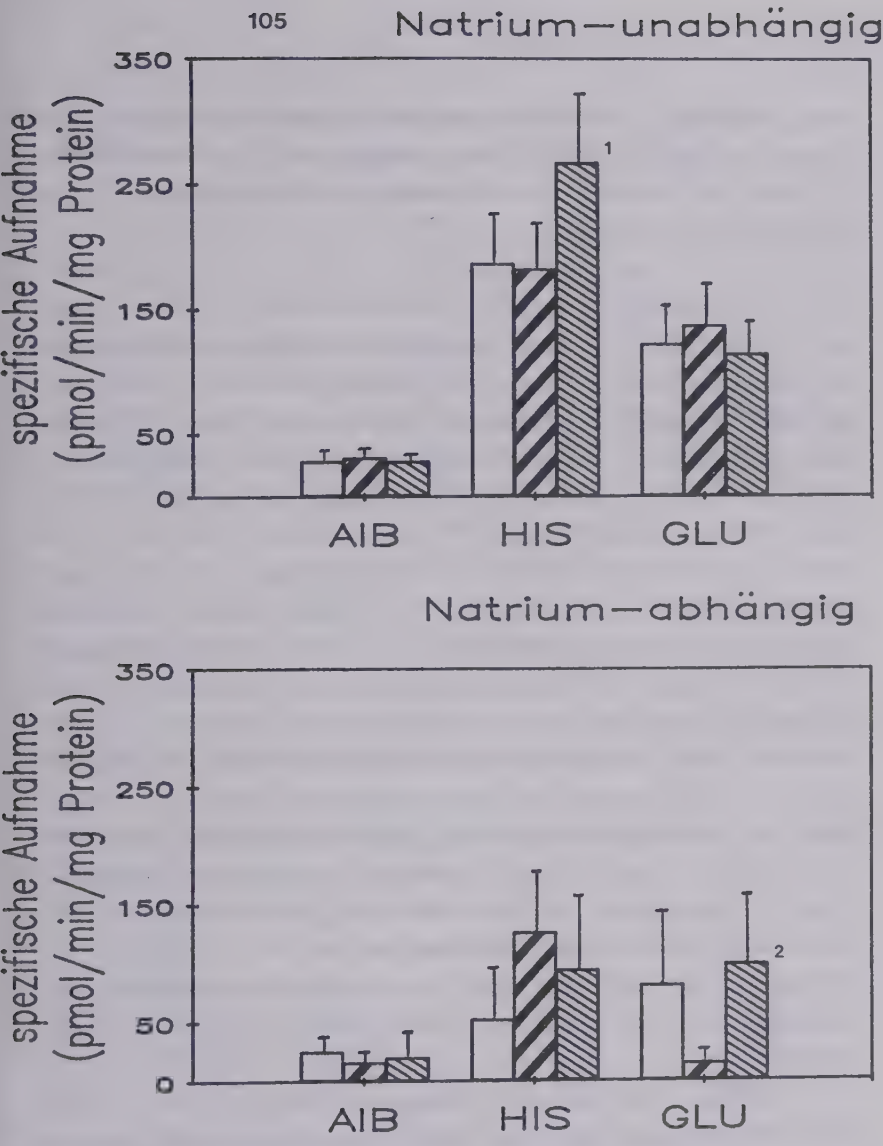


Abb. 14: Natrium-unabhängiger und -abhängiger Transport von α-Aminoisobutyrat (AIB), Histidin (HIS), und Glutamat (GLU) in normale (Hepatozytengesamtsuspension), periportale und perivenöse Hepatozyten. Der Transport wurde 1 h nach dem Absetzen der Zellen in Kulturschalen gemessen.
□ normal, ▨ perivenös (pv), ▨ periportal (pp). Angegeben sind Mittelwerte von 6 Kulturen ± SD. [1] signifkant verschieden von der periportalen Rate; $P<0,02$; $n=5$. [2] signifkant verschieden von der periportalne Rate; $P<0.01$; $n=5$.

uber System G^- in die perivenösen Hepatozyten war deutlich höher als in die periportalen, wohingegen die Aufnahmekapazitäten von System A und N zwischen den verschiedenen Subpopulationen gleich waren.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in den Transportkapazitäten zwischen den perivenösen und periportalen Zellen, die direkt nach der Isolierung gefunden wurden, auch während der Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum unter identischen Bedingungen erhalten bleiben, wurden die Zellen für mehrere Tage kultiviert. Zusätzlich zu den basalen Transportkapazitäten wurden die Transportraten nach Induktion der Zellen mit verschiedenen Hormonen bestimmt. Für die einzelnen Transportsysteme wurden diejenigen Hormonkombinationen ausgewählt, mit denen im Rahmen anderer Arbeiten die höchsten Induktionsraten erzielt wurden. So wurde die Aufnahme von Glutamat nach Induktion mit Dexamethason (51), von AIB nach Induktion mit Dexamethason und Glucagon (50) und von Histidin nach Induktion mit Dexamethason und Insulin (50) bestimmt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Versuchen, in denen die maximale Induktionsrate in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Hormonzugabe und von der Kultivierungsdauer bestimmt wurden (44), wurden die Aufnahmeraten für AIB nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 26 h und für Histidin und Glutamat nach 44 h gemessen.

In Abb. 15 ist die Aufnahme von AIB dargestellt. Die Natrium-abhängige Aufnahme über System A erfolgt, sowohl unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Dexamethason, in beiden Subpopulationen mit einer ähnlichen Rate. Hingegen wurde nach Induktion mit der Kombination aus Dexamethason und Glucagon eine deutlich höhere Aufnahme in den perivenösen Hepatozyten bestimmt. Die Natrium-unabhängige Aufnahme von AIB zeigt ein ähnliches Induktionsmuster zwi-

schen den beiden Subpopulationen. Auch hier ist die Aufnahme nach Induktion mit Dexamethason und Glucagon in die perivenösen Zellen deutlich höher.

Die Aufnahme von Histidin über System N, die in Abb. 16 dargestellt ist, war perivenös und periportal unter allen untersuchten hormonellen Bedingungen gleich hoch. Die Natrium-unabhängige Aufnahme von Histidin (Abb. 16 A) zeigt hingegen hochsignifikante Unterschiede sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach Hormonbehandlung. Die Aufnahmeraten waren in den perivenösen Präparationen stets höher.

Für die Aufnahme von Glutamat via System G^- wurden deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen gefunden (Abb. 17). Unter Kontrollbedingungen wird Glutamat nur in den perivenösen Kulturen meßbar aufgenommen. Nach Induktion des Transportsystems mit Dexamethason in beiden Zellpopulationen findet man immer noch eine deutlich höhere Transportkapazität in den perivenösen Zellpopulationen. Für die Natrium-unabhängige Aufnahme von Glutamat (Abb. 17 A) hingegen wurden bei allen untersuchten hormonellen Bedingungen keine Unterschiede gefunden.

Damit kann also festgehalten werden, daß die verschiedenen Zellpopulationen, die mit der Digitonin/Kolagenase-Methode gewonnen wurden, ihre Unterschiede in den Transportraten für verschiedene Aminosäuren auch nach Kultivierung unter identischen Bedingungen über mehrere Tage sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach Hormoninduktion aufrechterhalten können.

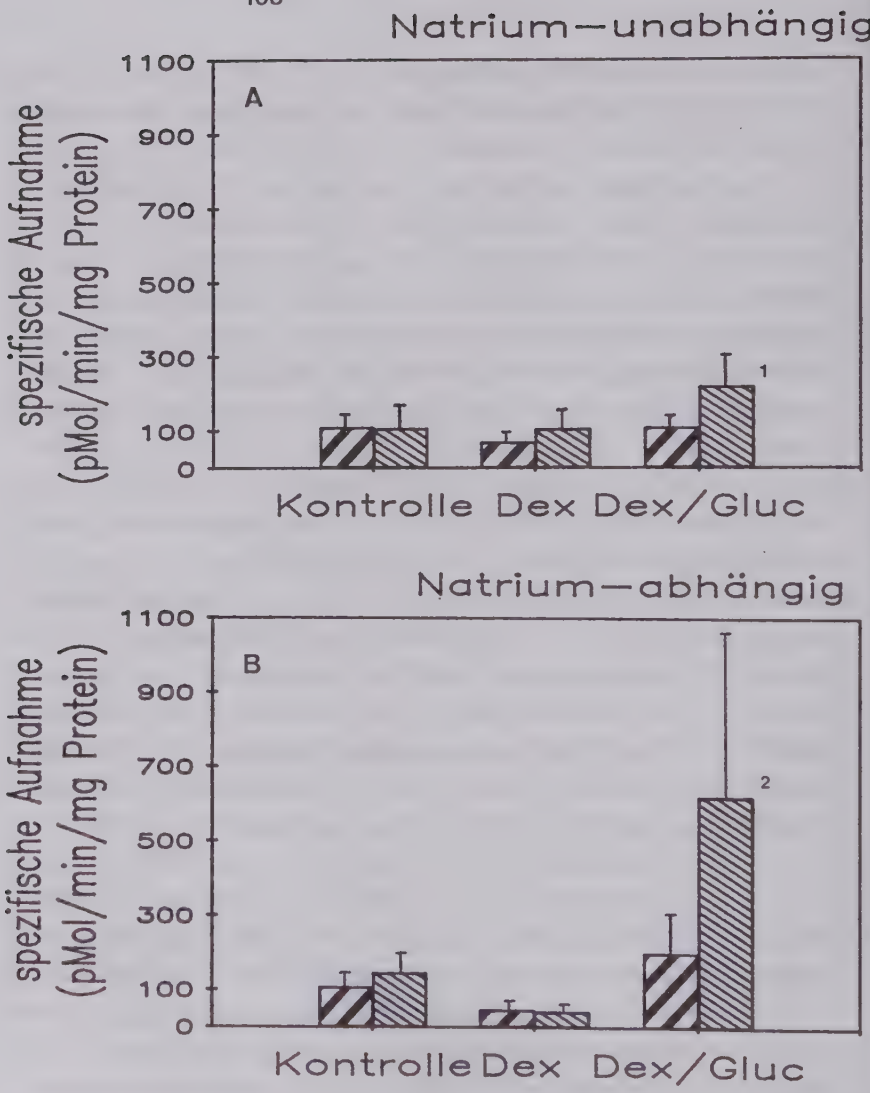


Abb. 15: Transportkapazitäten des Natrium-unabhängigen und Natrium-abhängigen und -unabhängigen Transports von α-Aminoisobutyrat in periportalen und perivenösen Hepatozyten nach Kultivierung in Gegenwart verschiedener Hormone. Die Aufnahme wurde nach 26 h Kultivierung (6 h nach Medienwechsel) gemessen. A) Die Natrium-unabhängigen Aufnahmen wurden ohne spezifische Inhibitoren gemessen. [1] verschieden von der periportalen Rate; $P < 0.03$; n=5. B) Die Natrium-abhängigen [2] Transportraten wurden in Gegenwart von 20 mM N-Methyl-AIB gemessen. [2] möglicherweise verschieden von der periportalen Rate; $P < 0.07$; n=5. Alle Werte stellen Mittelwerte ± SD dar.

periportal; perivenös

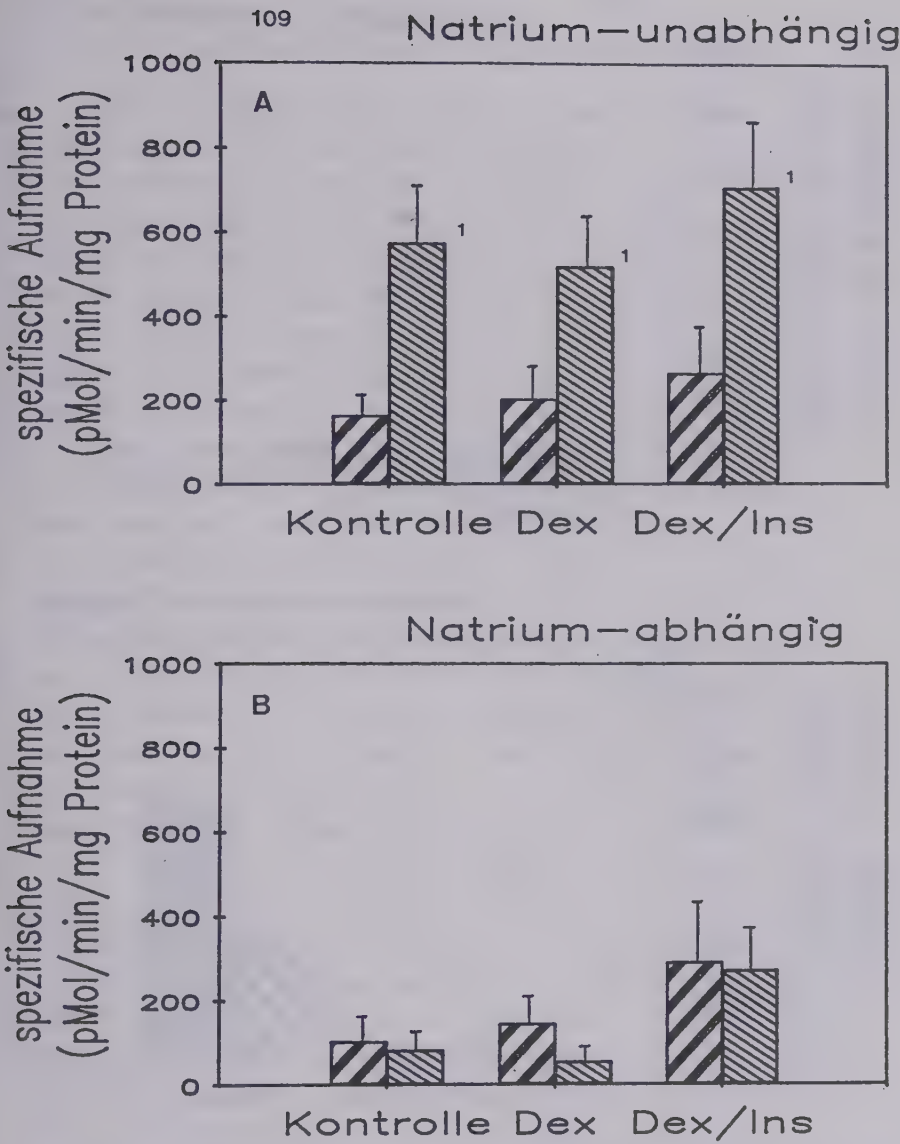


Abb. 16: Transportkapazitäten des Natrium-unabhängigen und Natrium-abhängigen Transports von Histidin in periportalen und perivenösen Hepatozyten nach Kultivierung in Gegenwart verschiedener Hormone. Die Aufnahme wurde nach 44 h Kultivierung (24 h nach Medienwechsel) gemessen. Die Aufnahmeraten wurden stets in Gegenwart von 20 mM N-Methyl-AIB gemessen. A) Natrium unabhängig: [1] signifikant verschieden von der periportalen Rate; $P < 0.005$; n=5. B) Natrium-abhängig: keine Unterschiede erkennbar, n=5. Alle Werte stellen Mittelwerte ± SD dar.

periportal; perivenös

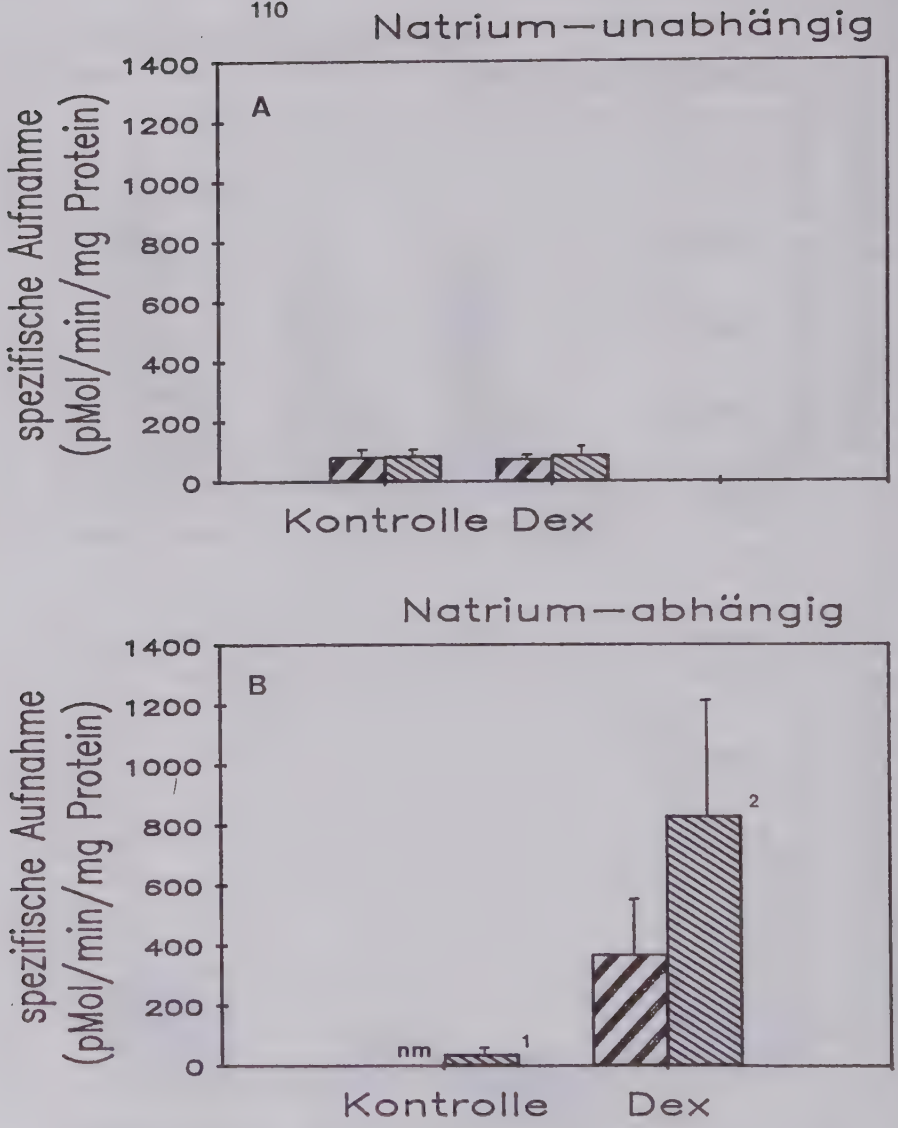


Abb. 17: Transportkapazitäten des Natrium-unabhängigen und Natrium-abhängigen Transports von Glutamat in periportalen und perivenösen Hepatozyten nach Kultivierung mit und ohne Dexamethason. Die Aufnahme wurde nach 44 h Kultivierung (24 h nach Medienwechsel) gemessen. Die Aufnahmen wurden stets in Gegenwart von 10 mM Cysteat gemessen. A) Natrium-unabhängig: kein Unterschied, n=7. B) Natrium-abhängig: [1] signifikant verschieden von der periortalen Rate, [2] signifikant verschieden von der periportalen Rate, P< 0.03; n=7. Alle Werte stellen Mittelwerte ± SD dar.

periportal; perivenös **nm** keine messbare Differenz

Da im Zusammenhang mit der extremen Verteilung der Glutaminsynthetase die Aufnahme des Substrats Glutamat in die Hepatozyten in den einzelnen Subpopulationen von besonderem Interesse ist, wurde die Kinetik des Glutamattransports durch Variation der Glutamatkonzentration über einen weiten Bereich (0.006-6 mM) in den perivenösen und periportalen Zellpopulationen untersucht. Isolierte normale, perivenöse und periportale Hepatozyten wurden in Williams Medium E in Gegenwart von Dexamethason für 44 h kultivert.

Die Abhängigkeit der direkt gemessenen Natrium-unabhängigen Aufnahme und der nach Abzug der Natrium-unabhängigen Komponente berechneten Natrium-abhängigen Aufnahmeraten von der Konzentration in einer normalen Zellkultur ist in Abb. 18 dargestellt. Funktionsparameter für ein sättigbares System und einen Diffusionsterm (Natrium-unabhängig) und für die Natrium-abhängigen Daten für ein sättigbares System bzw. zwei Systeme mit Sättigungscharakteristik wurden auf Grund der experimentellen Daten der einzelnen Experimente durch Computeranalyse angepaßt. Die optimale Anpassung der berechneten Funktionen an die Daten konnte hierbei in allen Fällen durch die Vorgabe nur einer sättigbaren Komponente erreicht werden. Die erhaltenen kinetischen Parameter der einzelnen Experimente wurden zusammengefaßt und sind in Tab. 8 dargestellt. Für den Natrium-unabhängigen Transport erhält man nach Abzug der Diffusion eine sättigbare Komponente mit ähnlichen kinetischen Parametern in den perivenösen und periportalen Kulturen. Die bestimmten Km-Werte und die Vmax-Werte in den Normalkulturen liegen etwas höher als in den Digitoninpräparationen. Die Km-Werte der Natrium-abhängigen Komponente sind bei allen Zellpopulationen ungefähr gleich hoch, während für Vmax in den periportalen Kulturen eine deutliche Abnahme zu erkennen ist. Allerdings wären zu aussagekräftigeren Vergleichen der Vmax-Werte aus diesen kinetischen Messungen auf Grund der großen Schwankungen zwischen

den einzelnen Präparationen eine mindestens ebenso große Anzahl von Einzelexperimenten notwendig, wie bei den Aufnahmemessungen mit konstanter Glutamatkonzentration. Aus den erhaltenen Km-Werten lassen sich dennoch gute Rückschlüsse auf die Charakteristika der Glutamataufnahme in den unterschiedlichen Populationen herleiten. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Unterschiede zumindest in den Natriumabhängigen Transportkapazitäten für Glutamat zwischen perivenösen und periportalen Zellen nicht von der Existenz zweier Systeme mit unterschiedlichen Km-Werten herrühren, sondern wahrscheinlich auf unterschiedliche Vmax zurückzuführen sein dürften.

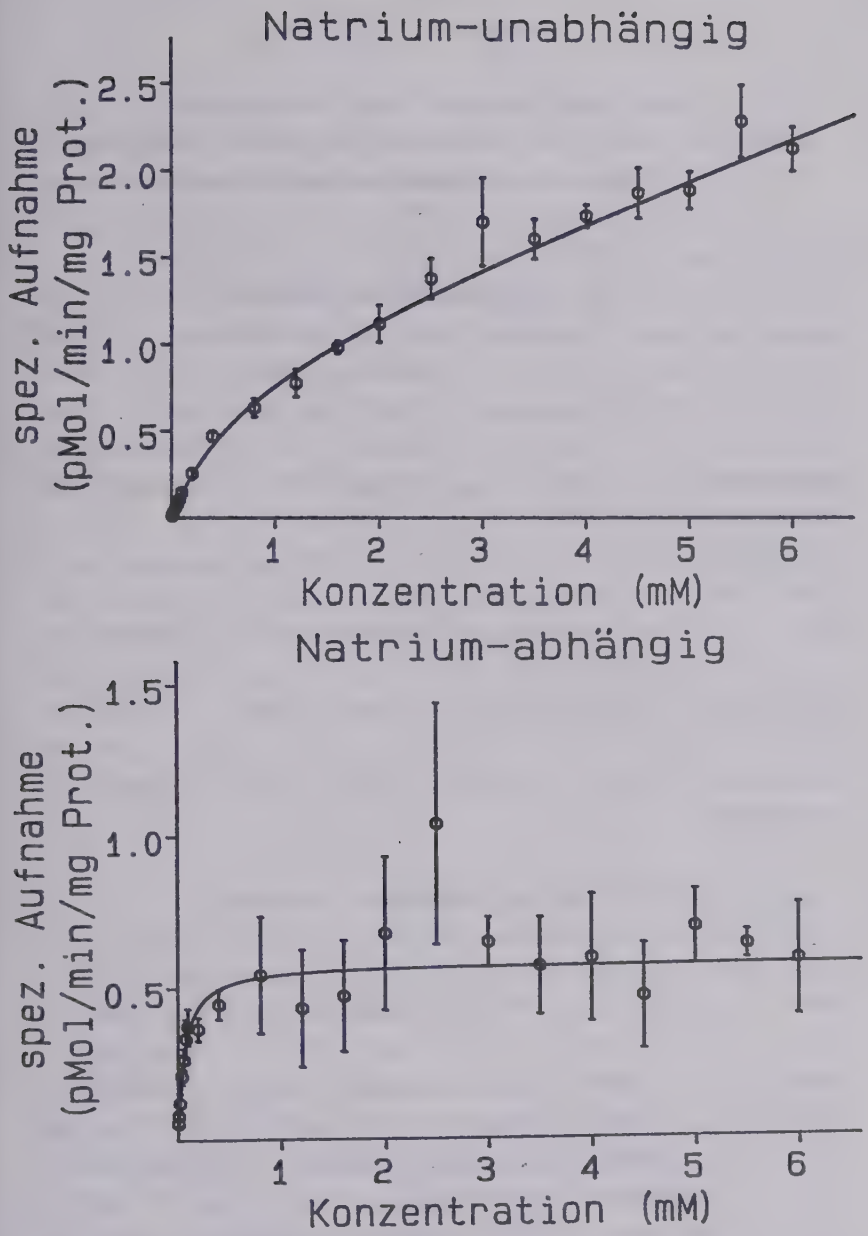


Abb. 18: Abhängigkeit der Natrium-unabhängigen und der Natrium-abhängigen L-Glutamat-Aufnahme von der L-Glutamatkonzentration. Isolierte Hepatozyten wurden 44 h in Williams E in Gegenwart von Dexamethason kultiviert. Die Aufnahmekapazität für L-Glutamat wurde für 21 Konzentrationen von 0,006 - 6 mM gemessen. Transportzeit 2 min. Angegeben sind Mittelwerte ± SD einer Dreifachbestimmung

Tabelle 8. Kinetische Charakterisierung des Dexamethason-induzierten Glutamattransports nach 44h Kultur.

Kinetische Konstanten	Zellsuspension: Gesamt (3)	Zellsuspension: Perivenös[c] (3)	Zellsuspension: Periportal[c] (1)
A: Natrium-unabhängiger Transport			
Km[a]	1,01 ± 0,30	0,52 ± 0,09	0,47
Vmax[b]	1,49 ± 0,45	0,73 ± 0,50	0,66
Diffusionskonstante	0,27 ± 0,04	0,23 ± 0,09	0,49
B: Natrium-abhängiger Transport			
Km[a]	0,079 ± 0,012	0,066 ± 0,01	0,036
Vmax[b]	1,04 ± 0,60	0,86 ± 0,30	0,28

[a],[b] Die Km-Werte sind in mM angegeben, die Vmax-Werte in nmol/min/mg Protein.
Die Werte stellen Mittelwerte ± SD aus der in Klammern angegebenen Anzahl von Bestimmungen dar.

[c] Perivenöse und periportale Zellen wurden mit der Digitonin/Kollagenase-Methode (147,59)isoliert.

3.5 Heterogenität von Hepatozytenantigenen

3.5.1 Membranassoziierte Antigene

Grundlage für die Versuche zur Gewinnung von Antikörpern gegen Plasmamembran-assoziierte Antigene waren die Befunde zur Heterogenität des Glutamat-Transports und der starken Stimulation dieses Transportsystems in der Kultur durch Dexamethason (44,74,51). Durch gezielte Antigensteigerung sollte ein Antiserum gewonnen werden, das einen hohen Antikörpertiter gegen Dexamethason induzierbare Antigene aufweist. Dieses Antiserum sollte durch Adsorption gegen Glutaminsynthetase-freie Zellen spezifisch gegen vorwiegend perivenös lokalisierte Dexamethason-stimulierbare Oberflächenantigene gemacht werden. Das resultierende Antiserum sollte geeignet sein, um entweder perivenöse Zellen zu markieren oder um perivenös lokalisierte Oberflächenantigene, die für spätere Strategien zur Isolierung von Glutaminsynthetase-positiven Zellen von Bedeutung sein konnten, auszusondern.

Dazu wurden die folgenden experimentelle Schritte durchgeführt:
(1) Anlage einer Kultur von Hepatozyten nach CCl_4-Behandlung der Ratten (s. Abschnitt 3.4.3.2), die praktisch keine Glutaminsynthetase-positiven Zellen mehr enthielt. (2) Kultivierung einer normalen Hepatozytenkultur für 48 h in Gegenwart von Dexamethason. Diese Stimulation sollte eine starke Zunahme von Dexamethason-induzierbaren Antigenen bewirken. (u.a. Glutamattransportsystem). (3) Grobreinigung und Charakterisierung einer Plasmamembranfraktion aus diesen Zellkulturen. (4) Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen die Membranassoziierten Antigene und (5) Reinigung dieses Antiserums durch Adsorption gegen eine CCl_4-

Kultur. (6) Charakterisierung des erhaltenen Antiserums durch immunologische Methoden. Leider erbrachte dieser Ansatz noch nicht das gewünschte Resultat im Hinblick auf perivenös lokalisierte Oberflächenantigene. Jedoch wurden Antiseren erhalten, die im Rahmen anderer Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe von großer Bedeutung sein könnten. Aus diesem Grund sollen die Experimente, die zur Gewinnung der Antiseren führten, sowie ihre Charakterisierung an dieser Stelle kurz vorgestellt werden:

Die Herstellung und Charakterisierung der CCl_4-Kulturen und von normalen Zellkulturen wurde bereits ausführlich weiter oben (Abschnitt 3.4.3.2 bzw. Abschnitt 2.7) beschrieben und wird damit an dieser Stelle nicht mehr wiederholt.

Plasmamembranfraktionen wurden aus kultivierten Hepatozyten nach der Methode von Chakravarthy et al. (m13) mittels Dichtegradientenzentrifugation in einem diskontinuierlichen Percollgradienten isoliert. Zur Charakterisierung der aufgereinigten Membranfraktionen wurde routinemäßig die Aktivität der 5'-Nukleotidase gemessen (127). Die 5'-Nukleotidase konnte durchschnittlich um den Faktor 15 ± 4 (n=4) gegenüber der Aktivität im entsprechenden Homogenat angereichert werden. Die Ausbeute an Protein in den Membranpräparationen bezogen auf den Gesamtproteingehalt im Homogenat lag bei 3.5 ± 1 %. Abb. 19 zeigt ein 10%-SDS-Polyacrylamidgel, in dem angereicherte Membranfraktionen aufgetrennt und anschließend gefärbt wurden.

Die Plasmamembranpräparationen, die die höchste Anreicherung der Aktivität der 5'-Nukleotidase aufwiesen, wurden zur Immunisierung zweier Kaninchen eingesetzt. Nach viermaliger Immunisierung im Abstand von 2 Wochen wurden Antiseren gewonnen, die einen hohen Titer gegen Hepatozyten im ELISA aufzeigten (Abb. 21).

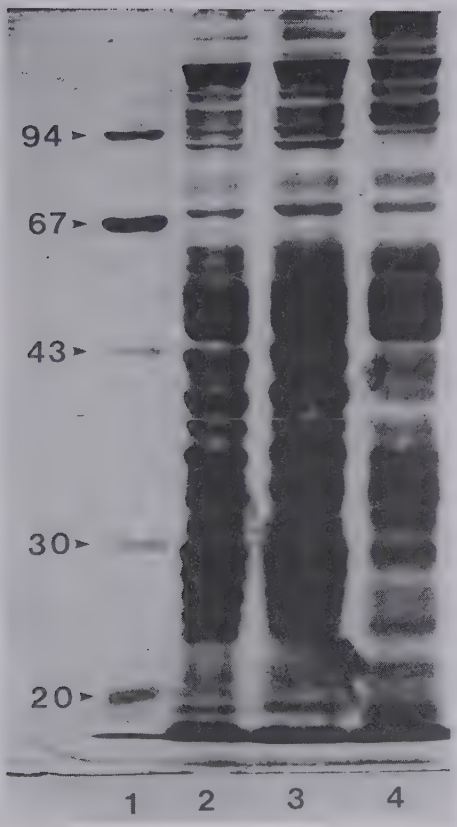


Abb. 19: 10%-SDS-Disk-Gelelektrophorese von verschiedenen Anreicherungsstufen der Zytoplasmamembran aus kultivierten Hepatozyten. Linie 1: Markerproteine, Linie 2: Leberhomogenat, Linie 3: Überstand nach 1000g-Zentrifugation zum Abtrennen von Kernen und Zellresten, Linie 4: angereicherte Zytoplasmamembranfraktion.

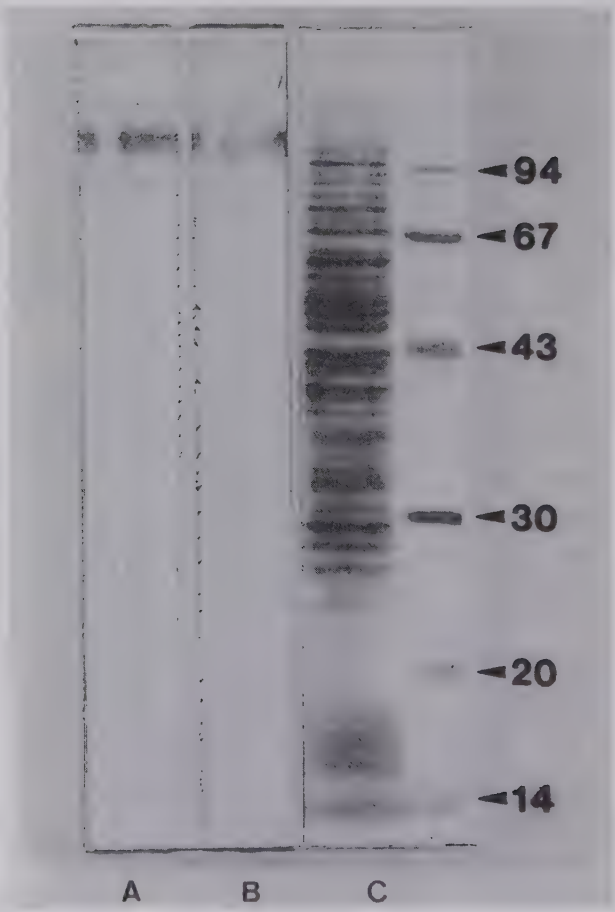


Abb. 20: Western Blot-Analyse von Antiserumchargen gegen Hepatozyten-Zytoplasmamembranen. A,B) Kaninchen-Antiseren gegen angereicherte Zytoplasmamembranfraktionen aus kultivierten Rattenhepatozyten; Mu I, Mu II. C) Bandenmuster eines Rattenleberhomogenats und Markerproteine der dazugehörenden SDS-Disk-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

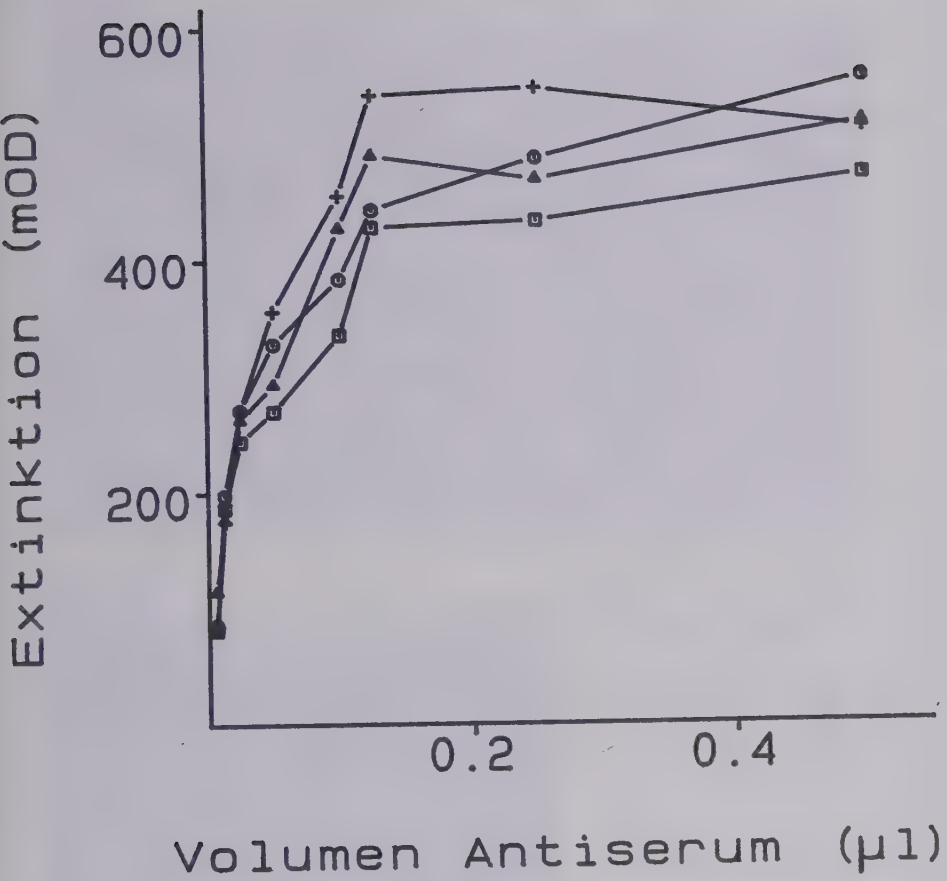


Abb. 21: Sättigungskurve von verschiedenen Anti-Plasmammembran-Serumchargen gegen angereicherte Zytoplasmamembranen aus kultivierten Hepatozyten. - ELISA-. Beschichtung mit 5 µg angereicherter Zytoplasmamembran/Trog, Absättigung mit 4%BSA, 100 µl Antiserum-Verdünnung/Trog (1:200-1:16.000) in PBS), 2. Antikörper: Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase konjugiert 1:1000 in PBS. Nachweisreaktion mit ABTS-Substratlösung, 30 min. ⊡ Mu I, ▲ Mu II, + MuIII, ⊙ MuIV. Die Extinktion wurde bei 410 nm gegen 490 nm als Referenzwellenlänge gemessen.

Zur Charakterisierung der Spezifität der erhaltenen Antiseren wurden die Seren im Westernblot gegen Leberzellhomogenat (Abb. 20) und gegen angereicherte Membranfraktionen getestet. Die Ergebnisse waren sowohl für die Seren aus beiden Kaninchen, wie auch mit beiden Proben qualitativ die gleichen. Erstaunlicherweise markierten die Antikörper praktisch ausschließlich Banden mit einem Molekulargewicht im Bereich von 110 kd.

Adsorption der Antiseren auf fixierten CCl_4-Kulturen brachte keine selektive Abreicherung einzelner Banden. Die eingesetzten Mengen an Antikörpern konnten durch Adsorption über eine entsprechende Anzahl von CCl_4-Kulturen vollständig adsorbiert werden. Kontrollversuche mit dem Serum nach Adsorption verliefen in allen Fällen negativ.

Die Homogenität der Markierung des Acinus wurde auch durch PAP-Färbung von fixierten Paraffinschnitten gezeigt (Abb. 22). Erstaunlicherweise ist eine starke Markierung ausschließlich an der kanalikulären Membran der Hepatozyten zu entdecken. Elektronmikroskopische Untersuchungen (Abb. 23) bestätigen eine überwiegende Lokalisierung der Immunogold-markierten Antigene an den Gallekanälchen.

Abb 22

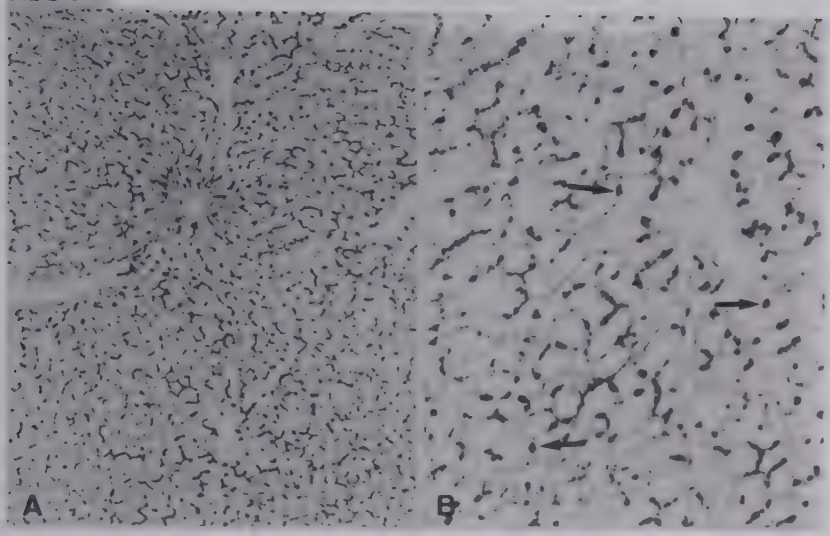


Abb 23

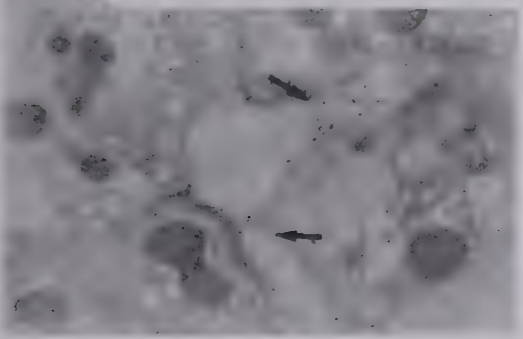


Abb. 22: Immunhistochemische Lokalisation der Antigene, die von den Antiseren gegen Zytoplasmamembranfraktionen markiert werden. A),B) Paraffinschnitte mit Immunfärbung (PAP-Technik) gegen angereicherte Zytoplasmamembran-Fraktionen aus kultivierten Rattenhepatozyten mittels hergestellten polyklonalen Kaninchen-Antiseren. Die starke Markierung der Gallekanälchen ist gut zu erkennen (Pfeile). A x150; B x210.

Abb. 23: Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation des Anti-Zytoplasmamembran-Serums Mu I -Immunogoldfärbung-. Die Goldpartikel überwiegend im Bereich der kanalikulären Membran (Pfeile) sind gut zu erkennen.
(in Zusammenarbeit mit Dr. H. Robenek, Münster)

3.5.2 Markierung periportaler und perivenöser Hepatozyten mit monoklonalen Antikörpern

3.5.2.1 Immunhistochemische Markierung im normalen Leberparenchym

Um festzustellen, ob sich Glutaminsynthetase-positive und -negative Hepatozyten auch in weiteren, insbesondere an der Zelloberfläche lokalisierten Eigenschaften unterscheiden könnten, wurden monoklonale Antikörper gegen Hepatozytenpopulationen hergestellt. Mit dem durchgeführten Ansatz gelang es noch nicht Antikörper herzustellen, deren Antigene eine Co-Lokalisation mit den Glutaminsynthetase-positiven Zellen zeigten. Es konnten jedoch Hybridomzellen kloniert werden, die Antikörper produzieren, die hervorragend zur Zuordnung von Zellen zu ihrem acinären Ursprungort geeignet sind. In Abb. 24 werden die beiden Antikörper BG8-B1 und BG11-D6 vorgestellt. Es ist zu sehen, daß der Antikörper BG8-B1 eine schmale Zone ausschließlich rings um die Portalfelder markiert. Die Ausdehnung der Färbung in die Zone 1 kann zwischen einzelnen Gewebeproben etwas variieren; eine Färbung von Zellen in Zone 2 und Zone 3 wurde jedoch nie beobachtet. Das Ergebnis dieser Lokalisation war gleichartig in unfixierten Gefrierschnitten und in Schnitten, die sofort nach dem Schneiden in 3.5% Paraformaldehyd fixiert wurden. Auch nach Fixation von frisch präparierten Leberstückchen sowohl in 3,5% Paraformaldehyd, wie auch in Dimethoxypropan (52) und anschließender Einbettung in Paraffin, erhielt man identische Ergebnisse. Der Antikörper BG11-D6 färbt ein Areal, das ungefähr der Zone 3 entspricht. Die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den terminalen hepatischen Venen

werden dabei etwas stärker angefärbt. Zu bemerken ist, daß bei beiden Antikörpern, besonders bei BG8-B1, die Markierung steil zu einem im wesentlichen ungefärbten Bereich abbricht. Dies deutet sich auch bei der Färbung von isolierten Hepatozyten an, worauf weiter unten noch genauer eingegangen wird. Auf Grund dieser Eigenschaften scheinen der Antikörper BG8-B1 für die Markierung von periportalen und der Antikörper BG11-D6 für die Markierung von perivenösen Hepatozyten geeignet zu sein.

Die genaue Lokalisation der Antigene in den Hepatozyten ist derzeit noch unbekannt. Die Färbung der Hepatozyten mit dem Antikörper BG8-B1 erfolgt nicht gleichmäßig über die Zellfläche hinweg, sondern scheint zu den Zellrändern hin stärker aufzutreten, während bei Färbung der Zellen mit dem Antikörper BG11-D6 eine gleichmäßigere Markierung der Zellen zu beobachten ist.

Abb. 25 zeigt die Bindung der beiden Antikörper im Westernblot an die entsprechenden Antigene im mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrenntem Leberhomogenat. Durch die Lage mittransferierter Markerproteine kann für das Antigen, das von dem Antikörper BG8-B1 erkannt wird, ein Molekulargewicht von 56 kd und für das Antigen, das von dem Antikörper BG11-D6 erkannt wird, ein Molekulargewicht von 48 kd bestimmt werden.

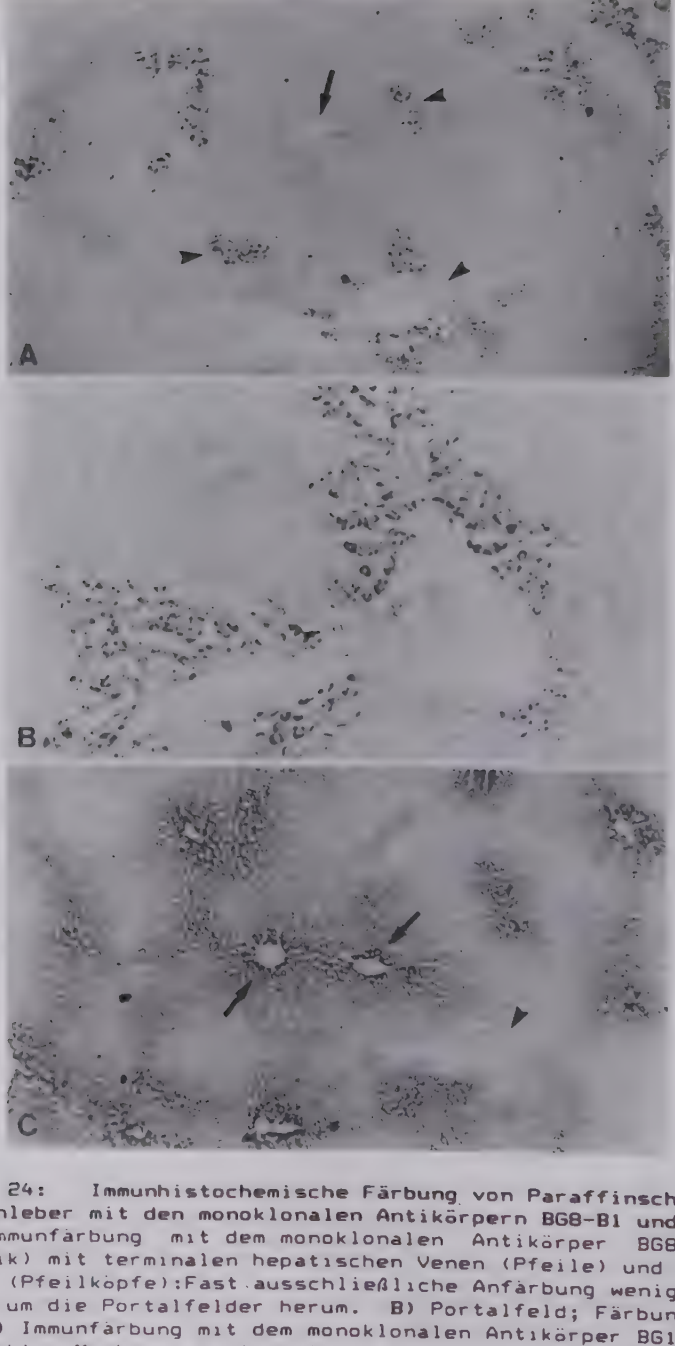


Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus Rattenleber mit den monoklonalen Antikörpern BG8-B1 und BG11-D6. A) Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper BG8-B1 (PAP-Technik) mit terminalen hepatischen Venen (Pfeile) und Portalfeldern (Pfeilköpfe):Fast ausschließliche Anfärbung weniger Hepatozyten um die Portalfelder herum. B) Portalfeld; Färbung mit BG8-B1. C) Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper BG11-D6 (PAP-Technik); Markierung wie bei A); bevorzugte Markierung perivenöser Hepatozyten. A,C x 60; B x 150.

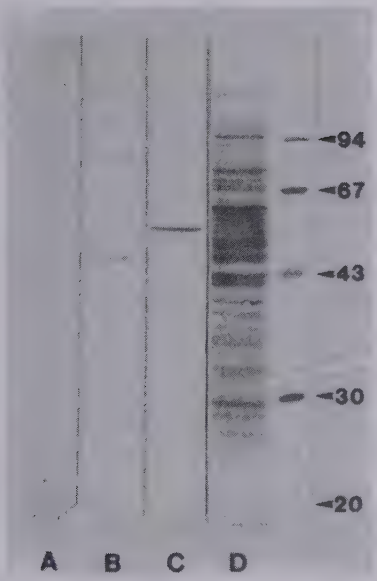


Abb. 25: Western Blot-Analyse der monoklonalen Antikörper BG8-B1 und BG11-D6. A) Kontrollblot; nur 2. Antikörper. B) BG11-D6 C) BG8-B1 D) Rattenleberhomogenat und Markerproteine der zugehörigen SDS-Disk-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

3.5.2.2 Immunzytochemische Charakterisierung von kultivierten Hepatozyten mit dem monoklonalen Antikörper BG8-B1

Im Gegensatz zu Glutaminsynthetase, die sowohl während der enzymatischen Dissoziation des Lebergewebes als auch während der Kultivierung der Hepatozyten eine äußerst stabile Verteilung zeigt ((52) und Abschnitt 3.3.1), findet man für das periportal lokalisierte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper BG8-B1 erkannt wird, ein interessantes Verhalten während der Kultivierung, das mit dem der Glutaminsynthetase stark kontrastiert. Auf dieses Verhalten soll deshalb im folgenden eingegangen werden.

Abb. 26 zeigt eine immunzytochemische Färbung von isolierten und kultivierten Hepatozyten mit dem monoklonalen Antikörper BG8-B1. Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen 30 min. nach dem Absetzen der Zellen beträgt ungefähr 20-22%. Die Zahl der gefärbten Zellen variiert zwischen einzelnen Präparationen stark. Es wurden auch schon Werte um ca. 40% geschätzt. Die Färbung tritt in den frisch isolierten Hepatozyten am Rand der Zellen stärker auf. Bei einzelnen Hepatozyten sind die Randbereiche allerdings nicht homogen gefärbt. Insgesamt findet man eine sehr heterogene Markierung in den einzelnen gefärbten Zellen. In der Kultur ist das Antigen keineswegs stabil. Bereits nach 4 h wurde es auch von zuvor negativ reagierenden Hepatozyten exprimiert. Nach 24 h sind fast alle kultivierten Hepatozyten gefärbt, wobei es zu einer homogeneren Färbung in den einzelnen Zellen kommt. Man erkennt in der Kultur gleichmäßig gefärbte Zellen mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten. Kultivierung der Hepatozyten für 24 h in Gegenwart verschiedener Hormone hatte keinen Einfluß auf die Expression des Antigens während der Kultivierung der Hepatozyten.

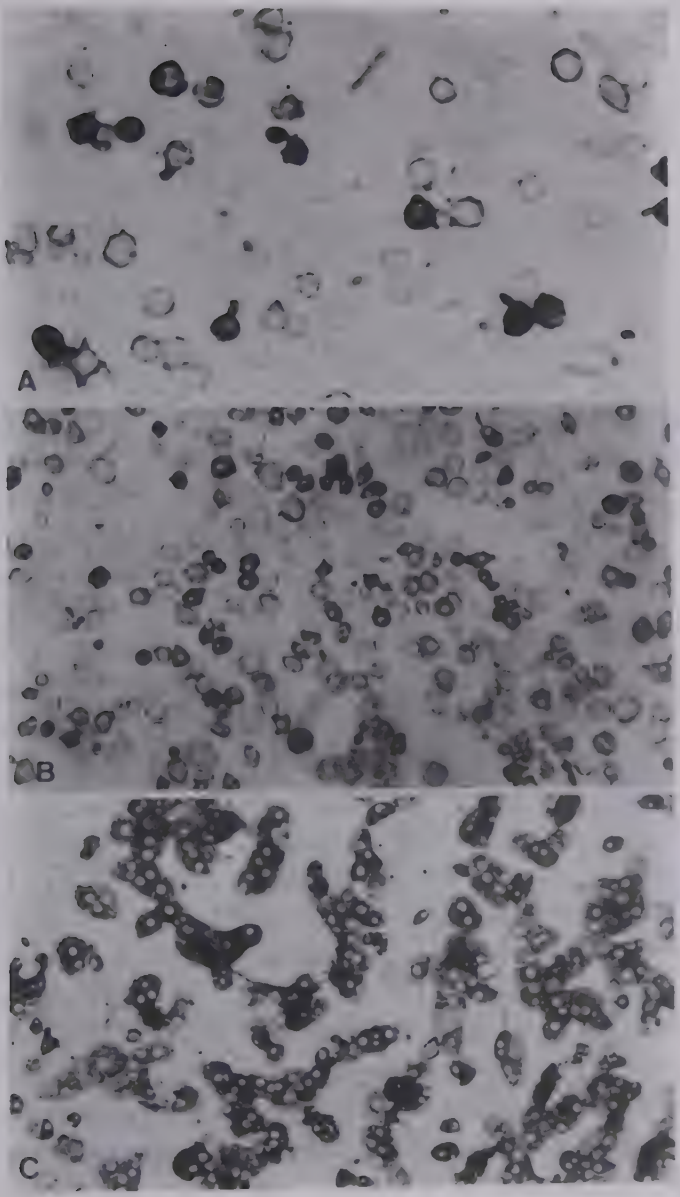


Abb. 26: Immuncytochemische Färbung von Hepatozyten in Primärkultur mit dem monoklonalen Antikörper BG8-B1. A) Hepatozytensuspension 30 min nach Kultivierung. Wenige Hepatozyten sind angefärbt. B) Hepatozytenkultur nach 4 h und C) nach 22 h. Eine zunehmende Zahl von Hepatozyten reagiert positiv mit dem monoklonalen Antikörper BG8-B1. Alle Färbungen wurden mit der PAP-Technik durchgeführt. A x 300; B,C x 160.

4. Diskussion

4.1 Heterogenität des Leberparenchyms in situ

Die zunehmende Zahl von Befunden zur heterogenen Verteilung von Stoffwechselwegen und von daran beteiligten Enzymen im Acinus (Literaturübersicht bei 94,62), beginnend mit den frühen Ergebnissen von Novikoff (138), führte sehr rasch zu der Erkenntnis, daß ein Verständnis des Stoffwechsels der Leber und der damit verbundenen Regulation ohne eine genaue Kenntnis nicht nur der intrazellulären, sondern auch der interzellulären acinären Verteilung der daran beteiligten Enzyme und Funktionen nicht mehr denkbar ist. Dies konnte vor allem am Beispiel des Glucose- und Kohlehydratstoffwechsels gezeigt werden (Literaturverweise bei 92,91). Das Modell der "metabolischen Zonierung" (94,92,91) ist hervorragend geeignet, funktionelle Zusammenhänge vor allem auch unter dynamischen Gesichtspunkten zu beschreiben. Auch für den Ammoniak- und Glutaminstoffwechsel existieren Befunde, die Unterschiede in den periportalen und perivenösen Aktivitäten der beteiligten Enzyme aufzeigen (Übersicht und Literaturverweise bei 72,77,90). Die Entdeckung der extremen Lokalisierung der Glutaminsynthetase (52), die mit der anderer Enzyme nicht vergleichbar ist, führte bald zu der Vermutung (54,53,74,79,173), daß die heterogene Verteilung dieses Enzyms und auch der damit zusammenhängenden Stoffwechselvorgänge grundsätzlich von der Art der Heterogenität, wie sie für den Kohlehydratstoffwechsel beschrieben wurde, verschieden sein dürfte. Diese Vermutung wurde inzwischen durch eine große Zahl von Untersuchungen, hauptsächlich zur Stabilität der acinären Verteilung der

Glutaminsynthetase (52,46) und auch durch die Lokalisation von anderen Enzymen, vor allem des Harnstoffzyklus (39,162,136), untermauert. Für weitere ähnlich extreme Verteilungen gibt es bisher nur Hinweise aus der Lokalisation des Antigens, das von dem monoklonalen Antikörper BG8-B1, der in dieser Arbeit beschrieben wird, erkannt wird. Dieses Antigen ist zwar ähnlich scharf, aber "invers", d.h. periportal lokalisiert. Die Beschreibung einer U-förmigen Lokalisation von Glutamatdehydrogenase (119) ist ein weiteres Beispiel für die Vielgestaltigkeit von Enzymverteilungen im Acinus. Zusammen betrachtet weisen alle diese Beispiele, wie auch die Lokalisation der Enzyme des Kohlehydratstoffwechsels, auf eine lineare Organisation des Acinus, d.h. mit oder entgegen dem Blutfluß, hin.

Die extreme Verteilung der Glutaminsynthetase wurde zuerst in immunhistochemischen Versuchen mit einem kreuzreagierenden Antiserum aus Schweineleber beobachtet. Mit der Isolierung von Glutaminsynthetase aus Rattenleber und der Verwendung eines spezifischen Antiserums, das gegen Rattenleber-Glutaminsynthetase im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde, konnte in einer Vielzahl von Versuchen in situ, sowohl in normaler Leber als auch nach Zerstörung des periportalen bzw. des perivenösen Areals mit Leber-toxischen Agentien, diese extreme Lokalisierung bestätigt werden, die damit unabhängig von der Herkunft des zum Nachweis verwendeten Antiserums ist.

4.2 Hepatozytensubpopulationen als experimentelles Modellsystem zur Untersuchung der Heterogenität des Leberparenchyms

Parallel zur Untersuchung von heterogenen Verteilungen in situ, hauptsächlich mit histochemischen und immunhistochemischen Methoden oder nach Mikrodissektion von gefrorener Leber (Übersicht bei 163,4,97), konzentrierten sich die Bemühungen unter anderem rasch auf die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung von isolierten Hepatozyten aus der periportalen und der perivenösen Zone. Während die zuerst erwähnten Methoden ein mehr statisches Bild vermitteln, in dem nicht zwischen dem Beitrag, der durch eine unterschiedliche zirkulatorische Mikroumgebung herrührt oder aber durch möglicherweise unterschiedliche Eigenschaften der Zellen selbst erklärt werden müßte, unterschieden werden kann, ist die Untersuchung von isolierten Zellen aus verschiedenen acinären Zonen die Methode der Wahl, unter denen alle Zellen unter identischen Bedingungen untersucht werden können. Besonders hervorgehoben werden soll in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Verwendung von Primärkulturen zur Untersuchung von gewissen Aspekten der Ursachen und Rolle der zonalen Heterogenität der Leberzellen. Vor allem die Möglichkeit, auch regulatorische Phänomene ohne Wechselwirkung mit dem übrigen Organismus, insbesondere mit dem endokrinen System zu untersuchen, hebt ihre besondere Bedeutung hervor (141,45). Auf Beiträge, die durch die Verwendung von Primärkulturen von periportalen und perivenösen Hepatozyten vor allem im Hinblick auf die Heterogenität im Transport von Aminosäuren erhalten wurden, soll später noch genauer eingegangen werden.

4.3 Charakterisierung von Hepatozytensubpopulationen hinsichtlich ihrer acinären Herkunft

Bisher wurden zahlreiche Versuche unternommen, um Zellen aus verschieden Zonen des Acinus zu erhalten (Übersicht bei 92,7,125). Die meisten dieser Ansätze verliefen entweder erfolglos oder hinterließen Zweifel hinsichtlich der Zuordnung der isolierten Zellen zu ihrem acinären Ursprung (92,7,125). Eines der größten Probleme bei diesen Untersuchungen war es, geeignete Kriterien zur Charakterisierung der Zellen zu finden, die eine unzweideutige Zuordnung der Zellen zu bestimmten Zonen des Acinus erlauben würden. Bisher hauptsächlich zur Charakterisierung verwendete Enzymaktivitäten weisen meistens nur flache Aktivitätsgradienten über den Acinus hinweg auf (92), die zum einen möglicherweise vom verwendeten Stamm und vom Geschlecht der Tiere abhängig sind und zum anderen starken Schwankungen, abhängig von der Ernährungslage und der Tageszeit, unterliegen können (164). Zusätzliche Probleme bei der Interpretation der periportal:perivenösen-Verhältnisse können bereits durch geringe Änderungen der Aktivitäten auftreten. Adaptive Änderungen oder Auslaufen von Enzymprotein während der Isolierung sind z.B. Faktoren , die sich nicht mit Sicherheit ausschließen lassen und in ihrer Auswirkung nur sehr schwer abzuschätzen sind.

4.4 Glutaminsynthetase als perivenöses Markerenzym in vivo und in vitro

Mit der Entdeckung der bemerkenswerten heterogenen Verteilung der Glutaminsynthetase und ihrer Stabilität unter einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Bedingungen in vivo (52,38,47) ist ein ausgezeichnetes Markerenzym für perivenöse Hepatozyten vorhanden. Allerdings sollte beachtet werden, daß die Lokalisation der Glutaminsynthetase nicht identisch mit der Zone 3 des Acinus ist. Der prozentuale Anteil dieser Zellen in normaler Rattenleber kann immunzytochemisch leicht bestimmt werden und beläuft sich auf 7-8 % der Gesamtparenchymzellzahl (52). Damit konnte die Anreicherung dieser Zellen in Hepatozytensubpopulationen recht einfach, sowohl durch Bestimmung der Enzymaktivität als auch durch Auszählen von Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten, unabhängig von Schwankungen der Enzymaktivität, bestimmt werden (s. auch 186).

Die beobachtete Stabilität der Glutaminsynthetase in vitro in Hepatozytenprimärkulturen, die sich in einer unveränderten interzellulären Verteilung selbst über einen längeren Zeitraum zeigt und nur leicht veränderliche Niveaus der Aktivität durch hormonelle Induktion aufweist (45,54,44), soll Anlaß zu einigen Bemerkungen über Bedingungen in der Primärkultur sein, die später noch im Hinblick auf das Verhalten von Aminosäuretransportprozessen interessant sein dürften. Im allgemeinen begünstigen die inadäquaten Bedingungen in der Primärkultur eine Vielfalt von phänotypischen Veränderungen (Übersicht bei 58). Dies sollte unter anderem auch, vor allem über einen längeren Zeitraum hinweg, die Einebnung präexistierender zonaler Unterschiede bewirken. Die Dynamik der Heterogenität im Bereich des Kohlehy-

dratstoffwechsels kann zum Beispiel durch die Induktion "perivenöser" oder "periportaler" Hepatozyten durch Insulin und Glucagon, die eine Angleichung der Enzymaktivitätsverhältnisse und der daraus resultierenden metabolischen Flüsse an die mutmaßlichen Zustände in Hepatozyten aus Zone 1 und Zone 3 bewirken, widergespiegelt werden (143,93). Allerdings mehrten sich vor allem in letzter Zeit einige Anzeichen für die Aufrechterhaltung zumindest einiger dieser Unterschiede auch über eine längere Kultivierungsdauer hinweg (46,148,145). Ein Beispiel hingegen für eine sehr rasche Aufhebung der heterogenen Verteilung als Folge einer möglichen Adaptation an das gleichartige Milieu sind die Veränderungen in der Lokalisation des periportalen Antigens, das von dem monoklonalen Antikörper BG8-B1 erkannt wird.

4.5 Trennung periportaler und perivenöser Hepatozyten

Gegenstand dieser Arbeit war zum einen die Anwendung und Bewertung bereits beschriebener Methoden zur Auftrennung von Hepatozyten einer Rattenleber in Fraktionen mit Hepatozyten unterschiedlicher acinärer Herkunft, zum anderen das Erarbeiten neuer methodischer Ansätze zur Gewinnung von Zellfraktionen, in denen periportale und perivenöse Hepatozyten möglichst klar voneinander getrennt vorliegen.

4.5.1 Dichtegradienten-Zentrifugation als ein geeignetes Mittel zur Gewinnung von Hepatozyten unterschiedlicher acinärer Herkunft?

Wie weiter oben bereits ausgeführt wurde (s. Abschnitt 1.4), enthalten perivenöse Zellen einen größeren Anteil an glattem endoplasmatischem Retikulum und auch an Mitochondrien (128,166,153,88), ultrastrukturellen Strukturen, die durchaus einen Einfluß auf die spezifische Dichte der Hepatozyten haben könnten. Diese Unterschiede sind allerdings nicht so groß und treten auch nicht stufenweise auf, so daß in kontinuierlichen Dichtegradienten keine Auftrennung der Zellen in diskrete Banden erwartet werden sollte. Eher wahrscheinlich ist die Verteilung der Zellen innerhalb einer einzelnen breiteren Bande. So wurde zuerst versucht, Hepatozyten nach Isolierung einer Gesamtzellsuspension auf Grund von Unterschieden in der spezifschen Dichte der Zellen weiter aufzutrennen. Durch die Verwendung von Percoll® (142) konnten hochauflösende kontinuierliche Dichtegradienten hergestellt werden, die trotz Variation der Percoll-Konzentration eine relativ konstante Osmolarität

aufweisen und wegen der geringen Viskosität der Lösung im Gegensatz zu Ficoll, einem früher häufiger verwendeten Medium (31,192), die Zentrifugation der Zellen unter recht schonenden Bedingungen erlaubten. Die Auftrennung der Hepatozyten erfolgte in zwei Banden, wovon die 'leichte Bande' praktisch ausschließlich nicht vitale, Trypanblau-positive Zellen und Zellen, die auf Grund ihrer Morphologie (viele Blebs, sehr unregelmäßige Zellkonturen) als geschädigt angesehen wurden, enthielt. Die übrigen Zellen verteilten sich ausschließlich in einer einzigen breiteren Bande, die zwar abhängig von der Art der verwendeten Zellen (Gesamtpopulation und perivenöse Zellen, bzw. nach Allylformiatbehandlung) zum Teil unterschiedliche Dichtebereiche repräsentierte, aber ihrer Form nach stets in sich stetig war. Daß die Zellen in dieser Bande eine sehr hohe Vitalität aufwiesen und insgesamt der Anteil an geschädigten Zellen mit dem der Ausgangssuspension vergleichbar war, weist auf die schonenden Bedingungen während der Zentrifugation hin. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Ergebnissen aus anderen Untersuchungen, die die Auftrennung der vitalen Hepatozyten in mehrere diskrete Banden beschreiben (59,31,18,137). Möglicherweise repräsentieren diese unterschiedliche Grade an Zellschädigungen, die durch zu hohe Zentrifugalkräfte (31,7) oder durch die Benutzung von unphysiologischen Medien zustande kommen könnten. Eine mögliche Vorbelastung der Zellen, die zu anschließender Schädigung während der Zentrifugation führen könnte, könnte auch durch eine zu lange Vorinkubation der Zellen in relativ unphysiologischen Medien oder unter Temperaturen, die ein höheres hypoxisches Risiko für die Zellen bedeuten, herbeigeführt werden. Deshalb wurden mit Ausnahme der Zellen, die aus mit Allylformiat vorbehandelten Ratten isoliert wurden, nur Zellen mit einer möglichst hohen Ausgangsvitalität für diese Versuche eingesetzt, die Vorinkubationszeit möglichst kurz gehalten und

die Temperatur während der Auftrennung möglichst niedrig bei ca. 4-8 ° C gehalten. Die Verteilung von vitalen Hepatozyten in einer einzigen breiteren Bande wurde auch von Bengtsson et al. (7) beschrieben, der ebenfalls versuchte, mögliche "Streßfaktoren" für die Zellen auf ein Minimum zu beschränken.

Die Verschiebung der mittleren Dichte der Hepatozyten aus mit Allylformiat vorbehandelten Zellen zu einem leicht höheren Wert, könnte auf die Vorbehandlung zurückzuführen sein. Veränderungen von Parametern, die die Dichte der Zellen beeinflussen, sind wahrscheinlich unter diesen Bedingungen nicht auszuschließen. Die Auftrennung von Zellpopulationen, in denen perivenöse Zellen (isoliert mit der Digitonin/Kollagenase-Methode, s. Abschnitt 3.4.3) auf das Dreifache angereichert sein dürften, zeigte keine Verschiebung zu einer geringeren mittleren Dichte, sondern ergab eine Dichteverteilung, die mit der der Gesamtzellen übereinstimmte. Dies ist ein Hinweis darauf, daß auch in perivenösen Zellen ein breites Dichtespektrum vorhanden ist und eine durch Dichtegradienten-Zentifugation erhaltene Fraktion mit angereichten periportalen bzw. perivenösen Zellen immer durch eine Kontamination mit Zellen aus anderen Bereichen in ihrer Verwendbarkeit limitiert sein dürfte.

Die Anreicherung von Hepatozyten aus einzelnen Bereichen des Acinus in den einzelnen Dichtepopulationen wurde durch die Bestimmung der Aktivität der Glutaminsynthetase bestimmt. So zeigte sich, daß in den Fraktionen, die nach Dichtegradienten-Zentrifugation von Gesamtzell- bzw. perivenös angereicherten Suspensionen erhalten wurden, höhere Glutaminsynthetase-Aktivitäten in Fraktionen mit geringerer Dichte erhalten wurden. Diese Anreicherung von Glutaminsynthetase-haltigen Zellen und damit möglicherweise auch insgesamt von perivenösen Zellen, war in den Gesamt-

zell-Suspensionen stärker zu sehen (D/A 1.88) als in den bereits mit perivenösen Zellen vorangereicherten (D/A 1.23). Die Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität weist darauf hin, daß in einigen Fraktionen diese Zellen bis auf das ungefähr Doppelte angereichert werden konnten. Jedoch zeigt die Tatsache, daß auch in allen anderen Fraktionen deutliche Aktivitäten dieses Enzyms bestimmt wurden, daß eine gute Trennung der Glutaminsynthetase-positiven und -negativen Hepatozyten nicht erreicht werden konnte. Vor dem Hintergrund der oben erwähnten Möglichkeit einer Kontamination mit Zellen aus den jeweils anderen Bereichen, braucht es nicht zu verwundern, daß die Aktivitäten anderer Markerenzyme, die sehr viel schwächere Gradienten über den Acinus hinweg aufweisen (Übersicht bei 92), in diesen Experimenten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Dichtepopulationen aufwiesen. Das recht uneinheitliche Bild der Verteilung der Enzymaktivitäten in den einzelnen Dichtepopulationen nach Auftrennung von Zellen aus mit Allylformiat vorbehandelten Ratten sollte im Zusammenhang mit der mangelnden Selektivität dieser Schädigung (47) bewertet werden und unterstreicht die Bedenken gegen die Verwendung von vor allem mit Allylformiat vorbehandelten Tieren, die bereits im Rahmen anderer Problemstellungen aufgetreten sind (47).

Zusammen mit den weiter oben angeführten grundsätzlichen Überlegungen zur Problematik von Markerenzymen zeigen diese Experimente, daß es zur eindeutigen Charakterisierung der Herkunft von mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Zellsuspensionen nicht ausreicht, nur wenige Markerenzyme zu bestimmen, die zudem noch größeren Schwankungen unterliegen können. So sollte zumindest für periportale Zellen, für die bis jetzt kein so idealer Marker wie die Glutaminsynthetase vorhanden ist, ein breites Spektrum von mehr periportal lokalisierten Enzymaktivitäten gemessen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Auftrennung von Hepatozyten mittels Dichtezentrifugation zeigen zwar eine Anreicherung von Zellen aus verschiedenen acinären Bereichen in einzelnen Fraktionen, bestätigen jedoch die Bedenken, die bereits von anderen Autoren hinsichtlich einer sauberen Trennung von periportalen und perivenösen Hepatozyten mittels Verfahren, die auf Unterschieden in der Zelldichte, Zellgröße oder Zelloberfläche beruhen, geäußert wurden (125,186). Die möglicherweise ungleichmäßigen und stark schwankenden Gehalte an Fett, Glykogen und anderen die Zelldichte beeinflußenden Faktoren könnten hauptsächliche Ursachen für die schlechte Selektivität dieser Methode sein.

4.5.2 Isolierung von Hepatozyten aus verschiedenen Bereichen des Acinus nach selektiver zonaler Schädigung mit Leber-toxischen Substanzen.

Prinzipiell anderer Art waren die Versuche zur Gewinnung von perivenösen oder periportalen Hepatozyten, die direkt auf der zonalen Lokalisation der Zellen beruhten.

Einerseits wurde versucht, ein Protokoll zu erarbeiten, das sich die selektive Zerstörung eines Teils des Acinus mit CCl_4 bzw. Allylformiat in vivo zunutze macht und anschließend noch die Isolierung und Kultivierung der restlichen Zellen erlauben würde, andererseits wurde im Endstadium dieser Arbeit die neuentwickelte Digitonin/Kollagenase-Methode von Quistorff (147) und Lindros & Penttilä (126) verwendet, mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals, im Gegensatz zu den Zentrifugationsverfahren, eine gute Trennung von Glutaminsynthetase-positiven und -negativen Hepatozyten erreicht wurde.

Der erste experimentelle Ansatz beruhte auf der bekannten selektiven zonalen Schädigung, die durch CCl_4 verursacht wird (139,198). CCl_4 verursacht eine Nekrose der Hepatozyten im perivenösen Bereich des Acinus als eine Folge seiner Metabolisierung zu einem CCl_3-Radikal durch eine Cytochrom-P_{450} abhängige Oxidation. Dies konnte leicht durch die praktisch vollständige Zerstörung der Glutaminsynthetase enthaltenden Zellpopulation nach Behandlung der Ratten über einen Zeitraum von 3 Tagen gezeigt werden, während nach nur eintägiger Behandlung immer noch einige dieser Zellen nachweisbar waren (52,47). Eine umfassende Charakterisierung dieser Schädigung des Leberparenchyms unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens der Glutaminsynthetase-positiven Zellen wurde von Gebhardt et al. (47) durchgeführt. Basierend auf diesen Befunden konnte ein Protokoll zur Isolierung und Kultivierung einer Subpopulation von Hepatozyten, die sich hauptsächlich aus Zellen aus Zone 1 und 2 zusammensetzt, entwickelt werden. Diese Zellen sollten besonders für Untersuchungen der Leberheterogenität im Hinblick auf den Ammoniakstoffwechsel geeignet sein, da sie fast ausschließlich Zellen des "afferenten Harnstoffkompartiments" (53,54) repräsentieren dürften. Die Behandlung der Ratten mit CCl_4 führt jedoch nicht nur zu Nekrosen in der perivenösen Zone, sondern kann über die Zellmembranen auch Hepatozyten in anderen Teilen des Acinus beeinflussen (16). Damit stellt sich die Frage, inwieweit Ergebnisse, die mit diesen Zellen erhalten werden, die ursprüngliche funktionelle Kapazität der Zellen widerspiegeln. Die Kultivierung der Zellen bewirkt wahrscheinlich eine mehr oder weniger vollständige Wiederherstellung der Integrität der Zellen, was morphologisch z. B. am Verschwinden der Fetttröpfchen gesehen werden kann. Da jedoch auch die Kultivierung hinsichtlich der phänotypischen Stabilität nicht ganz unproblematisch ist (58), müssen die jeweiligen Ergebnisse vor einer

Interpretation einem genauen Vergleich und einer sorgfältigen Bewertung unterzogen werden.

Eine generelle Zellschädigung im Acinus, die durch CCl_4 verursacht wird, zeigt sich an Hand der schlechten Vitalität der isolierten Zellen (nur 70% Trypanblau-negative Zellen, im Vergleich zu normalerweise über 90% in den Kontrollen), dem hohen Gehalt an Fetttröpfchen und hauptsächlich auch an der Tatsache, daß sich Hepatozyten, die 24 Std nach nur einmaliger Behandlung mit CCl_4 isoliert wurden, nicht an die Kulturbedingungen adaptieren konnten (46). Obwohl einige dieser Veränderungen (niedrige Vitalität, zahlreiche Fetttröpfchen) auch nach längerer CCl_4-Behandlung in den Hepatozyten auftreten, zeigen diese ein davon bemerkenswert verschiedenes Verhalten in der Primärkultur. Die Zellen heften sich wie normale Hepatozyten rasch an die Kulturschalen an, breiten sich gut aus und bilden eine Monolayer in der durch CCl_4 ursprünglich verursachte Schäden rasch repariert werden können (z.B Verschwinden von Fetttröpfchen). Diese drastischen Unterschiede könnten durch das Einsetzen des Regenerationsprozesses, der parallel zu der verlängerten Behandlung mit sublethalen Dosen an CCl_4 eintritt, bewirkt werden. Eine verbesserte Adaptation an Kulturbedingungen unter regenerativen Verhältnissen wurde auch schon früher in Arbeiten zur Isolierung von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie beobachtet (11,13).

Die Wiederherstellung der funktionellen Integrität der Hepatozyten, die nach dem in dieser Arbeit und dem bei Gebhardt & Burger (46) beschriebenen Protokoll isoliert und kultiviert wurden, zeigt sich auch in den metabolischen und regulatorischen Eigenschaften dieser Zellkulturen. So entspricht eine leicht erhöhte Kapazität der Gluconeogenese und der Harnstoffsynthese in diesen Kulturen einem Muster, wie es für Hepatozyten des "afferenten Harnstoffkompartiments" charakteristisch sein sollte. Weiterhin weisen Ergebnisse

zur Induzierbarkeit von Tyrosin-Aminotransferase durch Dexamethason in diesen Kulturen (46) auf eine funktionierende hormonelle Regulation hin. Diese Befunde werden in (46) ausführlich vorgestellt und diskutiert. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen charakteristischen Befunde zum Transport von Aminosäuren und der hormonellen Regulation dieser Prozeße in diesen Kulturen werden weiter unten, zusammen mit den Ergebnissen, die mit der Digitonin/Kollagenase-Technik erhalten wurden, diskutiert.

Im zweiten experimentellen Ansatz wurde von der Beobachtung, daß Allylformiat selektiv periportal Nekrosen verursachen kann (151), Gebrauch gemacht. Für die selektive Schädigung nach Allylformiat-Behandlung werden zytotoxische Effekte des Aldehyds Acrolein verantwortlich gemacht, der nach Aktivierung von Allylformiat durch die Alkoholdehydrogenase gebildet wird (152). Befunde zu Veränderungen der Enzymspiegel verschiedener zonaler Markerenzyme nach Kurzzeitbehandlung von Ratten, vor allem im Hinblick auf die Stabilität der Lokalisation der Glutaminsynthetase (47), bildeten die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur experimentellen Schädigung des Parenchyms durch Allylformiat.

Die Aktivität der Harnstoffzyklusenzyme und der überwiegend periportal lokalisierten Glutamat-Pyruvat-Transaminase kann bei einmaliger Behandlung mit Allylformiat erst nach Behandlung mit sehr hohen Dosen, die allerdings auch bereits zu Nekrosen in der intermediären Zone führen und ein längeres Überleben der Tiere nicht erlauben, deutlich erniedrigt werden (47). Basierend auf den Untersuchungen zur Kultivierung von Hepatozyten nach CCl_4-Vorbehandlung wurde versucht, durch Verlängerung der Vorbehandlung mit sublethalen Dosen, regenerative Prozesse anzuregen, die für die Kultivierbarkeit von isolierten Zellen von Vorteil sein

könnten. Die Tiere konnten während dreitägiger Behandlung mit mittleren Dosen (bis 50 µl/kg) über mehrere Tage am Leben gehalten werden. Die auftretenden Leberzellnekrosen unter diesen Bedingungen waren nicht allzu schwerwiegend. Allerdings ist die Schädigung im Gegensatz zu den Kurzzeitbehandlungen (47) nicht länger auf den periportalen Bereich beschränkt, sondern über das ganze Parenchym, einschließlich der perivenösen Zone, verbreitet. Diese massive Leberschädigung spiegelte sich in den Serumspiegeln der Transaminasen nicht wieder; diese waren ähnlich wie nach einmaliger Behandlung (47) 24 Std nach der letzten Injektion bereits wieder auf dem Ausgangsniveau. Nach Langzeitbehandlung mit Allylformiat mit der oben angegebenen Dosis, war eine deutlich sichtbare Reduktion der Glutaminsynthetase-positiven Fläche zu erkennen, die nach quantitativer Auswertung (47) auf 30% der ursprünglich vorhandenen Fläche berechnet wurde. Diese immunhistochemischen Befunde werden durch die Messung der Aktivitäten der Glutaminsynthetase und von anderen Markerenzymen bestätigt.

Wahrscheinlich werden die anfänglichen Änderungen, die für einige Enzyme beobachtet wurden (47), während einer Langzeitbehandlung durch weitere Veränderungen modifiziert. Für solche sekundären Veränderungen könnten adaptive Mechanismen, ein Verlust der zonalen Selektivität oder auch die Induktion von regenerativen Prozessen verantwortlich sein. Auf einen Verlust der zonalen Selektivität der Schädigung deutet, am Beispiel der bisher unter keinen Bedingungen adaptiv reagierenden Glutaminsynthetase, die Ausweitung der Schädigung in Bereiche distal von der primären Läsion hin. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde davon Abstand genommen, aus Allylformiat geschädigten Tieren Hepatozyten für die Primärkultur zu isolieren.

Da eine selektive periportale Schädigung von Hepatozyten, die eine anschließende Isolierung und Kultivierung von intakten Hepatozyten aus mehr distal zur Primärläsion lokalisierten Bereichen erlauben würde, auf Grund der hier erhalten Ergebnisse nicht möglich erscheint und die Kultivierung von Hepatozyten nach CCl_4-Behandlung nur die Untersuchung von Zellen aus Zone 1 und 2 erlaubt, ist die Digitonin/Kollagenase-Technik (147,126) im Moment sicherlich eine der besten Methoden zur Anreicherung von periportalen und von perivenösen Hepatozyten.

Mit dieser Technik können jeweils perivenöse oder periportale Hepatozyten in einer hohen Ausbeute und mit einer sehr guten Selektivität isoliert werden, was sich vor allem in den hohen perivenös:periportal-Verhältnissen der Glutaminsynthetase-Aktivität ausdrückt.

Die Bestimmung der perivenös:periportal-Verhältnisse anderer bisher verwendeter Markerenzyme weisen, vor allem am Beispiel der Pyruvatkinase, darauf hin, daß es zur genauen quantitativen Bestimmung der Selektivität einzelner Präparationen und in diesem Zusammenhang hauptsächlich von periportalen Präparationen, für die bisher noch kein so selektiver und einfach zu bestimmender Marker wie Glutaminsynthetase vorliegt, notwendig wäre, zumindest ein breiteres Spektrum an Markerenzymen zu verwenden.

Eine Vorbehandlung mit irgendwelchen Agentien oder die Benutzung spezieller Diäten ist nicht erforderlich, da die Isolierung nicht auf Unterschieden in den physikochemischen Eigenschaften der Zellen beruht.

Ein Hauptproblem hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, der Selektivität und der Vitalität besteht darin, daß eine absolut gleichmäßige Perfusion der Acini in den einzelnen Leberlappen praktisch nicht zu erreichen ist. In röntgenangiographischen Untersuchungen an Ratten wurde auch in vivo ein gelegentlich auftretender zirkulatorischer Kurzschluß

innerhalb zentraler Bereiche des Acinus beobachtet (25), der, falls er in der perfundierten Leber ebenfalls auftritt, die Selektivität der Zellzerstörung beeinträchtigen könnte (147).
Nicht vitale Zellen, die in diesen Präparationen in einem etwas höheren Ausßmaß auftreten, müssen deshalb vor Beginn der Experimente entweder durch eine Percollzentrifugation oder durch Kultivieren der Zellen entfernt werden.

Die Untersuchungen in angereicherten perivenösen Zellen, die zur Co-Lokalisation von Carbamoylphosphat-Synthetase in einem Teil der Hepatozyten und zur Quantifizierung der Verteilung dieser Enzyme führten, dürften interessante Aspekte für die Diskussion über die Ursachen der Heterogenität im Glutaminstoffwechsels bieten. Zusammen mit den Befunden zur Stabilität der Verteilung der Glutaminsynthetase unter Bedingungen, bei denen die Carbamoylphosphatsynthetase ihre selektive Lokalisation verliert und praktisch überall im Acinus exprimiert wird (57), lassen diese Ergebnisse vermuten, daß es sich möglicherweise nicht um streng reziprok wirkende Kontrollmechanismen bei der Expression dieser Enzyme handelt (44).

4.6. Heterogene Verteilung des Aminosäuretransports

Da die Digitonin/Kollagenase-Technik (147,126) derzeit die geeignetste Methode zur Anreicherung von perivenösen und periportalen Hepatozyten sein dürfte, sollen die Ergebnisse, die mit dieser Methode gewonnen wurden, zuerst besprochen werden. In der relativ kurzen Zeit der Digitonininfusion dürften keine adaptiven Veränderungen in den Hepatozyten zu erwarten sein. Damit sollten die in diesen Zellen gemessenen Unterschiede direkte Rückschlüsse auf die Heterogenität in

vivo möglich machen.

Die Untersuchungen zur Heterogenität des Aminosäuretransports zeigen bemerkenswerte Unterschiede zwischen den verschiedenen Subpopulationen. So werden für den Natrium-unabhängigen Transport von Histidin in den perivenösen Zellpopulationen stets höhere Transportraten gefunden. Der Natrium-abhängige Transport von Histidin (via System N) zeigt hingegen keinen Unterschied. Jedoch werden für den Natrium-abhängigen Transport von Glutamat (System G^-) deutliche Unterschiede gefunden. Damit findet in Übereinstimmung mit Befunden von Häussinger & Gerok (74) die Aufnahme von Glutamat hauptsächlich in den perivenösen Hepatozyten statt.

Diese Unterschiede zwischen den Subpopulationen werden auch während der Kultivierung der Zellen aufrechterhalten. Der Natrium-unabhängige Transport von Histidin ist, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Hormonstimulation, in perivenösen Zellen immer höher. Auch für die Aufnahme von Aminosäuren über System A und G^- werden in den Primärkulturen deutliche Unterschiede zwischen den Zellpopulationen gefunden, die unter Kontrollbedingungen denen direkt nach der Isolierung der Zellen zumindest in qualitativer Hinsicht entsprechen. Nach Hormonstimulation findet man bei System G^- eine kräftige Stimulation auch in den periportalen Zellen, jedoch ist auch hier die Aufnahme in die perivenösen Zellen stets höher. Die Heterogenität im Falle von System A nach Hormoninduktion ist ein Novum. Diese Daten unterstreichen allgemein die Gültigkeit des Konzepts der "metabolischen Zonierung" (94,92,91), das besagt, daß funktionell verbundene Stoffwechselwege in denselben Regionen des Acinus lokalisiert sind. Die Existenz dieser ausgeprägten Unterschiede der Aminosäuretransport-Kapazitäten, auch nach Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum unter identischen Bedingungen, ist jedoch auch im Hinblick auf die bisher postulierten Ursachen der Heterogenität im Acinus,

wie unterschiedliche Sauerstoff- und Substratversorgung und unterschiedliche Innervierung (90), von großem Interesse. Auch Quistorff berichtete über die Aufrechterhaltung von funktionellen Unterschieden während der Kultivierung von periportalen bzw. perivenösen Hepatozyten (148). Damit sollten neben Unterschieden in der mikrozirkulatorischen Umgebung, auch den Zellen möglicherweise direkt zuzuweisende unterschiedliche Eigenschaften bei der Suche nach den Ursachen der Heterogenität herangezogen werden.

Vor dem Hintergrund der früher geäußerten Meinung, daß die Leber praktisch impermeabel für Glutamat sei (70), ist die hohe Aktivität des Transports von Glutamat nach Induktion mit Dexamethason von besonderem Interesse (51). Von Gebhardt & Mecke wurden früher Messungen durchgeführt, die außer einer Natrium-unabhängigen Komponente zwei Natrium-abhängige Systeme vorschlugen, die am Transport von Glutamat beteiligt sein könnten (51). Die hier erhaltenen Km-Werte für die Natrium-unabhängige Komponente in den perivenösen und periportalen Hepatozyten stimmen mit den publizierten Werten (0,53 mM) recht gut überein, während der Km-Wert in den Gesamtzellpräparationen etwas höher liegt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte kinetische Analyse für den Natrium-abhängigen Glutamattransport relativiert die Annahme von Gebhardt & Mecke, daß ein hoch- und ein niederaffines System am Glutamattransport beteiligt wären (51). Aus den hier aufgeführten Befunden, die auf einer weitaus umfassenderen Datengrundlage basieren, geht eindeutig hervor, daß am Natrium-abhängigen Transport nur eine sättigbare Komponente beteiligt ist. Die Unterschiede in den bestimmten Km-Werten der sättigbaren Natrium-unabhängigen Komponente des Glutamattransports zwischen den Gesamtzellpopulationen und den nach Digitoninbehandlung erhaltenen Hepatozyten sind bisher noch nicht erklärbar. Zwar sind nach der Digito-

ninbehandlung keine morphologisch sichtbaren Schäden in den distal zu den Primärläsionen liegenden Zonen erkennbar, dennoch können generelle Einflüße der Digitoninbehandlung auf distal liegende Bereichen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Hepatozytenkulturen aus CCl_4-vorbehandelten Ratten umfassen nur die Zellen aus Zone 1 und Zone 2. Das Fehlen der Zellen aus Zone 3 kann vor allem durch die Abwesenheit der Glutaminsynthetase-positiven Zellen nachgewiesen werden. Abweichend von der Induzierbarkeit von System A und System N, die sogar noch ausgeprägter ist als in den Normalkulturen (46), bricht die hormonelle Regulation des Glutamattransports in den CCl_4-Kulturen fast vollständig zusammen. Es ist nicht wahrscheinlich, daß dieser Ausfall der Induzierbarkeit von System G^- durch Dexamethason auf eine allgemeine Membranschädigung oder einfache Hormoninsensitivität zurückzuführen ist. Zusätzlich zur hormonellen Induzierbarkeit von System A weisen auch die Befunde zur Induktion von System N und der Tyrosin-Aminotransferase auf eine funktionelle Intaktheit, sowohl von membranständigen als auch von zytoplasmatischen Hormonrezeptoren hin (46). Dieses Ergebnis paßt zwar auf den ersten Blick zu Vorstellungen und Befunden zur heterogenen Lokalisation des Glutamattransports (74), wäre aber vom Ausmaß her nicht ganz im Einklang mit den Unterschieden, die zwischen den mit der Digitonin-Methode erhaltenen periportalen und perivenösen Hepatozyten gefunden wurden. Von Gebhardt wurde vermutet, daß auch der Glutamattransport durch den regenerativen Prozeß, der wahrscheinlich die Isolierung und Kultivierung der Zellen nach längerer CCl_4-Behandlung erst möglich macht, beinträchtigt werden könnte (44). Eine dafür denkbare Erklärung wäre eine selektive Hemmung der Dexamethasonwirkung (z.B. durch Insulin). Diese Idee wird durch Beobachtungen unterstützt, die zeigen,

daß vor der Behandlung mit Dexamethason zugegebenes Insulin auch in normalen Kulturen die Induktion hemmen kann (44). Insulin-ähnliche Aktivitäten, die an der Kontrolle des regenerativen Prozeß beteiligt sind (122,197), könnten auf ähnliche Art und Weise wirken. Die Ergebnisse, die mit der Digitonin/Kollagenase-Methode zur Lokalisation des Glutamattransports erhalten wurden, unterstützen diese Bedenken und weisen auf die Begrenztheit dieses Modells hin.

Ein beachtenswerter Punkt, der auch in diesen Kulturen sichtbar wird, ist jedoch die Tatsache, daß manche präexistierenden Unterschiede, ob bedingt durch unterschiedliche Zonierung der Zellen oder durch regenerative Effekte, auch nach längerer Kultivierung manifestiert bleiben und auch durch hormonelle Behandlung der Kulturen nicht immer aufgehoben werden.

4.7 Physiologische Bedeutung der Heterogenität des Aminosäuretransports im Stoffwechsel von Glutamin und Glutamat

Ein wichtiger Aspekt des Glutaminstoffwechsels und der Harnstoffbildung in der Leber ist die ausgeprägte zonale Heterogenität der beteiligten Stoffwechselwege (54,53,79,77). Durch immunhistochemische Techniken konnte die Glutaminsynthetase ausschließlich in Hepatozyten in einem kleinen Bereich um die terminalen hepatischen Venolen lokalisiert werden (52), während Schlüsselenzyme des Harnstoffzyklus praktisch dazu komplementär im restlichen Teil des Acinus nachgewiesen wurden (39,162,136). Diese Befunde wurden durch Perfusionsuntersuchungen unterstützt, in denen die Glutaminsynthese zur perivenösen Zone zugeordnet werden konnte, während sich das Harnstoff-synthetisierende Kompartiment

dazu stromaufwärts befindet (50). Weiterhin wurden die Enzyme des Aminosäurekatabolismus und der Gluconeogenese überwiegend in der periportalen Region lokalisiert (Übersicht bei 92).

Der Transport durch die Zytoplasmamembran wird zumindest für einige Aminosäuren, z.B. für Glutamin (81) und Alanin (175,35) als geschwindigkeitsbestimmender Faktor für deren Metabolisierung in der Leber beschrieben. Die Bedeutung des Aminosäuretransports wird außerdem durch die Existenz eines Transportsystems (System N) für Glutamin, Asparagin und Histidin, das bisher ausschließlich in Leberzellen nachgewiesen werden konnte (89,105), unterstrichen. Die besondere Rolle des Aminosäuretransports kommt weiterhin in der komplexen Regulation der Aminosäuretransportsysteme zum Ausdruck, die nicht nur adaptive Regulation (System A (120,99,104) und N (105,66) umfaßt, sondern auch eine komplexe hormonelle Regulation von System A (171), von System N (54,50) und von dem für den Transport von Glutamat verantwortlichen System (System G^-)(54,51).

Acinäre Unterschiede in den Transportkapazitäten, die für den Glutaminstoffwechsel von Bedeutung sind, müssen vor dem Hintergrund der interzellulären Kompartimentierung des Glutaminstoffwechsels betrachtet werden, die nicht mit der normalerweise üblichen zonalen Einteilung des Acinus übereinstimmt. Der besonderen Lokalisation dieser Stoffwechselwege wird besser durch die Verwendung der Terme "efferentes Glutaminkompartiment" ,markiert durch die extreme Verteilung der Glutaminsynthetase, und "afferentes Harnstoffkompartiment", das den übrigen Teil des Acinus umfaßt, Rechnung getragen (53,54).

Die Tatsache, daß System N im basalen und im hormoninduzierten Zustand in periportalen und perivenösen Hepatozyten ähnliche Transportkapazitäten aufweist, deutet darauf hin, daß zumindest alle Zellen des "afferenten Harnstoffkom-

partiments" über ein entsprechendes Transportsystem verfügen. Ob auch die Glutaminsynthetase-positiven Zellen dieses Transportsystem besitzen, kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Einen interessanten Gesichtspunkt bilden die Unterschiede, die für den Natrium-unabhängigen Transport von Histidin und damit wahrscheinlich auch für Glutamin gemacht wurden, und eine deutlich stärkere Aufnahme, sowohl im basalen, als auch im induzierten Zustand in den perivenösen Hepatozyten zeigen. Diese Beobachtungen passen zu den Ergebnissen von Fafournoux et al. (34), die einen Eintransport von Glutamin hauptsächlich über System N vorschlagen, während der Efflux von Glutamin vor allem bei höheren intrazellulären Konzentrationen durch erleichterte Diffussion über ein Natrium-unabhängiges System erfolgen soll. Dies würde im Widerspruch zu einem Vorschlag von Häussinger et al. (81) stehen, der auf indirekten metabolischen Daten aus Untersuchungen an perfundierter Leber basiert. Diese Autoren schlagen für eine periportale Aufnahme und eine perivenöse Abgabe von Glutamin ein gemeinsames Natrium-abhängiges Transportsystem vor. Die hier aus direkten Transportmessungen erhaltenen Daten, die eher auf die Bedeutung von zwei verschiedenen Transportsystemen abheben, scheinen insofern mehr den wahrscheinlichen physiologischen Verhältnissen zu entsprechen, nach denen Glutamin periportal gegen einen Konzentrationsgradientene (81) in die Zellen aufgenommen werden muß, während Glutamin, das perivenös in den Zellen des "efferenten Glutaminkompartiments" synthetisiert wird, und damit in diesen in höheren Konzentrationen angeboten wird, ins Blut abgegeben werden muß.

Für die zweite in diesem Zusammenhang wichtige Aminosäure, das Glutamat, wurde zum erstenmal von Häussinger & Gerok auf eine Heterogenität im Acinus aufmerksam gemacht

(74). Diese Autoren schlugen auf Grund von metabolischen Studien an perfundierter Rattenleber eine überwiegend periportale Abgabe und eine perivenöse Aufnahme von Glutamat vor. Evidenzen für einen Natrium-unabhängigen Transport konnten nur für den Efflux von Glutamat beigebracht werden (78). Die Vermutung der Autoren, daß auch die Aufnahme von Glutamat überwiegend Natrium-unabhängig stattfindet und damit die dafür verantwortlichen Glutamat-Transportsysteme verschieden von den Natrium-abhängigen Transportsystemen, die in anderen Arbeiten beschrieben wurden, sein sollten (73,79), ist aus der Sicht der hier vorgestellten Ergebnisse wenig wahrscheinlich. Diese weisen auf eine starke Heterogenität eines Natrium-abhängigen Transportsystems für Glutamat hin, die sich in kaum meßbaren Transportraten in periportalen Zellen, im Vergleich zur Aufnahme in die perivenösen Zellen, zeigt. Die Bedeutung dieses Transportsystems wird zusätzlich durch eine beständig höhere Aufnahmekapazität in perivenösen Zellen, selbst nach hormoneller Induktion während der Kultivierung der Zellen, unterstrichen. Die Natrium-unabhängigen Transportraten zeigen hingegen keinerlei Heterogenität.

Die deutliche Transportkapazität via System G^-, die nach hormoneller Induktion auch in den periportalen Hepatozyten nachgewiesen werden konnte, könnte durch ein möglicherweise unterschiedliches Verwertungsmuster der Hepatozyten unter verschiedenen hormonellen Verhältnissen interpretiert werden. So könnte vielleicht unter speziellen physiologischen Bedingungen Glutamat den Zellen des Harnstoff-synthetisierenden-Kompartiments als Substrat für die Harnstoffbildung und die Gluconeogenese zur Verfügung gestellt werden. Der Glutamatefflux, der durch α-Ketosäuren induziert wird (78), könnte zusätzlich eine Rolle in einem "Hin- und Herschieben" von Glutamat zwischen den verschiedenen Kompartimenten spielen.

Eine möglicherweise höhere Aufnahmekapazität über System A, das am Transport wichtiger Substrate für die Gluconeogenese beteiligt ist, in den perivenösen Hepatozyten nach hormoneller Induktion wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Hepatozyten aus dem periportalen Bereich besitzen ebenfalls eine deutliche Transportkapazität für α-Aminoisobutyrat. Dies paßt zu den Befunden, daß die Enzyme des Aminosäurekatabolismus überwiegend periportal lokalisiert sind (Übersicht bei 92) und somit funktionell zusammenhängende Prozesse in den gleichen Bereichen des Acinus lokalisiert sind (94,92,91). Die Frage nach der Bedeutung eines umgekehrten Gradienten des Transports über System A unter speziellen hormonellen Bedingungen muß derzeit noch offen bleiben.

Eine genauere Untersuchung der Lokalisierung der Aminosäuretransportfunktionen auf zellulärer Ebene erfordert wahrscheinlich eine feiner abgestufte Auftrennung von Hepatozytensubpopulationen hinsichtlich ihrer acinären Herkunft. So kann mit der im Bezug auf den Glutaminstoffwechsel nur groben Trennung in periportale und perivenöse Hepatozyten in vielen Fällen keine eindeutige Zuordnung auf zellulärer Ebene erfolgen. Ein weiterer Fortschritt in dieser Richtung dürfte erst mit der Isolierung einer einheitlichen Glutaminsynthetase-positiven Hepatozytenpopulation zu erwarten sein.

4.8 Immunologische Ansätze zur Identifizierung und Untersuchung von heterogen verteilten Antigenen.

Die außerordentlich strenge und stabile Lokalisation der Glutaminsynthetase-haltigen Hepatozyten direkt um die terminalen hepatischen Venolen führte zu der Vermutung, daß eine Wechselwirkung mit dem Endothel der benachbarten Gefäße direkt über Zell-Zell-Kontakte oder indirekt über abgegebene Signalsubstanzen allein oder in Kombination wichtig entweder für die Aufrechterhaltung oder die Determinierung dieses speziellen Phänotyps sein könnte (44). Dies würde auch die Existenz spezifischer Strukturen auf den Oberflächen dieser Zellen wahrscheinlich machen.

Ein direkter Ansatz zur Anreicherung bzw. Isolierung von Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten aus einer Hepatozytengesamtsuspension bietet wahrscheinlich nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn es gelingt spezifische Antigene auf der Oberfläche der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten zu identifizieren. Vor diesem allerdings noch reichlich hypothetischen Hintergrund wurde versucht, Hinweise auf die Existenz weiterer heterogen verteilter Antigene zu erhalten.

Die vorläufigen Ergebnisse zur Verwendung von angereicherten Hepatozytenplasmamembranen zur Immunisierung, die zwar nicht zur Identifizierung eines interzellulär heterogen verteilten Antigens, sondern zur Identifizierung von stark intramembranär heterogenen Antigenen geführt hatten, bildeten die Basis für den folgenden experimentellen Ansatz: Für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen möglicherweise perivenös stärker vorkommende Hepatozytenantigene mußte vor allem erreicht werden, daß die extrem stark immunogen reagierenden Strukturen, die von dem Antiserum gegen

die kanalikulär lokalisierten Antigene erkannt werden, möglichst gut maskiert werden. Dies konnte durch eine entsprechende Vorbehandlung mit Hilfe von Antiseren, gegen Hepatozyten hauptsächlich aus Zone 1 und 2 recht gut erreicht werden. Die Versuche erbrachten bisher noch nicht das gewünschte Ergebnis hinsichtlich der Identifizierung eines perivenös lokalisierten oder sogar für Glutaminsynthetase-Zellen spezifischen Antigens auf der Oberfläche der Zellen, lieferten aber, zusätzlich zu der Gewinnung von anderen recht interessanten Antikörpern, wertvolle Erkenntnisse für die Planung und experimentelle Durchführung weiterer Versuche in dieser Richtung.

So zeigt die rasche Adaptation des Antigens, das von dem periportal reagierenden Antikörper BG8-B1 markiert wird, daß bei einem Screening, das mit isolierten perivenösen und periportalen Zellen durchgeführt werden könnte, die Zellen möglichst rasch nach der Isolierung fixiert werden sollten, um so möglicherweise rasch auftretende adaptive Änderungen, die zum Ausgleich von zuvor existierenden Heterogenitäten führen könnten, zu vermeiden.

Die Wahrscheinlichkeit, Antikörper-produzierende Klone gegen spezifische Oberflächenmarker der Glutaminsynthetase-positiven Zellen zu erhalten, dürfte sich mit der Verwendung von stärker angereicherten Glutaminsynthetase-positiven Zellpopulationen zu Immunisierung erhöhen. Die Herstellung reiner Glutaminsynthetase-haltiger Zellpopulationen, die allerdings fixiert und damit möglicherweise in ihrer Oberflächenstruktur verändert wären, ist nach Isolierung und Fixierung einer perivenösen Zellpopulation, der anschließenden Markierung der Glutaminsynthetase-haltigen Zellen mittels des Anti-Glutaminsynthetase-Antikörpers und einer Fluoreszenzmarkierung dieser Zellen einfach vorstellbar. Durch Einsatz eines Fluoreszenz-aktivierten-Zellsorters sollten sich die markierten Zellen unschwer abtrennen und in

zur Immunisierung bzw. zum Screening ausreichender Menge gewinnen lassen.

Damit sollte die Erzeugung von Antikörpern gegen perivenös lokalisierte Oberflächenantigene, die möglicherweise zu einer noch besseren Anreicherung der Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten über Affinitätsadsorptions-Verfahren dienen könnten oder sogar gegen spezifische Oberflächenstrukturen der Glutaminsynthetase-positiven Zellen, die die direkte Isolierung einer reinen Population von intakten Glutaminsynthetase-positiven Hepatozyten erlauben würde, erfolgversprechend angegangen werden können.

Das Verhalten des periportal lokalisierten Antigens in der Primärkultur, das von dem Antikörper BG8-B1 erkannt wird, wirft einige Fragen auch im Hinblick auf die möglichen Ursachen für die extreme Heterogenität der Glutaminsynthetase auf. Bisher wurde von Gebhardt & Mecke (52) die Ansicht vertreten, daß Gradienten humoraler Art, die als wichtige determinierende Faktoren vor allem für die unterschiedliche Expression der Stoffwechselwege im Glucosemetabolismus diskutiert werden (94,90), für die Alles- oder Nichts-Verteilung der Glutaminsynthetase nicht in Betracht kommen dürften. Dies könnte im Fall der Glutaminsynthetase, die ja in der Primärkultur eine außergewöhnliche Stabilität zeigt (52,53), durchaus wahrscheinlich sein. Vor dem Hintergrund der raschen Veränderung der Verteilung des periportalen Antigens in der Kultur (allgemeine Induktion) unter gleichen Expositionsbedingungen ("periportales Milieu" ?) bleibt allerdings die Frage nach möglicherweise anderen determinierenden Substanzen durchaus offen (44). Eine einfache Gradiententheorie scheint allerdings für die Glutaminsynthetase relativ unwahrscheinlich zu sein (44). Weitere Untersuchungen mit dem periportalen Marker BG8-B1 unter ähnlichen Bedingungen wie bei der Glutaminsynthetase können

vielleicht zur Aufklärung der determinierenden Faktoren für diese heterogene periportale Verteilung beitragen.

5. Literaturverzeichnis

(1) Arias, I.M., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A.. eds. (1982) The liver - biology and pathobiology. Raveb. Press, New York

(2) Barber, E.F., Handlogten, M.E., Kilberg, M.S. (1983) J. Biol. Chem., 258:11851-11855

(3) Barber, E.F., Handlogten, M.E., Vida, T.A., Kilberg, M.S. (1982) J. Biol. Chem., 257:14960-14967

(4) Baron, J., Voigt, J.M., Kawabata, T.T., Redick, J.A. in: Regulaton of hepatic metabolism (R.G. Thurman, F.C. Kaufman and K. Jungermann,eds),1986, Plenum Press, New York and London.

(5) Bass, R., Hedegaard, H.B., Dillehay, L., Moffett, J, Englesberg, E. (1981) J. Biol. Chem., 256:10259-10266

(6) Becher, H., Mecke, D., Kleinen, R., and Mertz, D.F. (1974) Klin. Wochenschr., 52:396-397

(7) Bengtsson, B.G., Kiessling, K.-H., Smieth-Kielland, A., Morland, J. (1981) Eur. J. Biochem., 118:591-597

(8) Bengtsson, G., Kiessling, K.-H., Axelsson, K. (1978) IRCS Med Sci., 6:119

(9) Bergmeyer, U., Bernt, E. (1974) eds. in : Methoden der Enzymatischen Analyse, 3rd ed. Weinheim, Verlag Chemie.

(10) Bernaert, D., Wanson, J.-C., Mosselmans, R., de Paermentier, F, Drochmans, P. (1979) Biol. Cell., 34:159-174

(11) Bissell, D.M., Hammaker, L.E., Meyer, U.A. (1973) J. Cell. Biol., 59:722-734

(12) Bond, A., Chieregatti, G., Eusebi, V., Fulcheri, E, Bussolati, G. (1982) Histochemistry, 76:153-158

(13) Bonney, R.J., Becker, J.E., Walker, P.R., Van Potter, R. (1974) In Vitro, 9:399-413

(14) Bonney, R.J., and Maley, F. (1975) in: Gene expression and carcinogenesis in cultured liver. (Gershon, L.E., Thompson, E.B., eds.), Academic press, New York, 24-54

(15) Brinkmann, A., Katz, N., Sasse, D., Jungermann, K. (1978) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie, 359:1561-1571

(16) Cameron, G.R., Karunaratne, W.A.E. (1936) J.Path. Bact., 42:1-21

(17) Canivet, B., Fehlmann, M., Freychet, P. (1980) Mol. Cell. Endocrinol., 19:253-261

(18) Castagna, M., Chauveau, J. (1969) Exp. Cell Res., 57:211-222

(19) Chakravarthy, B.R., Spence, M.W., Clarke, J.T.R., Cook, H.W. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 812:223-233

(20) Chambers, J.W., Georg, R.H., Bass, A.D. (1965) Mol. Pharmacol., 1:66-76

(21) Christensen, H.N. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 779:255-269

(22) Christensen, H.N. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 779:255-269

(23) Christensen, H.N., Oxender, D.L., Liang, M., Vatz, K.A. (1965) J. Biol. Chem., 240:3609-3616

(24) Clark, R., Thompson, R.P.H., Borirakchanyavat, V. (1973) Lancet, 1:66-70

(25) Daniell, P.M., Pritchard, M.M.L. (1951) J. Physiol. (London), 114:521-537

(26) Daoust, R. (1958) Am. Inst. Biol. Sci. Publ., 4:3-10

(27) Davidson, D.G., Eastham, W.N. (1966) Br. Med. J., 2:506-507

(28) Davis, B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404

(29) Deschenes, J., Valet, J.-P., Marceau, N. (1981) Cell Biophys., 3:321-334

(30) Deuel, T., Louie, M., Lerner, A. (1978) J. Biol. Chem., 253:6111-6118

(31) Drochmans, P., Wanson, J.-C., Mosselmans, R. (1975) J. Cell. Biol., 66:1-22

(32) Elias, H. (1949) Science, 110:470

(33) Epstein, C.J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 57:327-334

(34) Fafournoux, P., Demigne, C., Remesy, C., Le Cam, A. (1983) Biochem. J., 216:401-408

(35) Fafournoux, P., Remesy, C., Demigne, C. (1983) Biochem. J. 210:645-652

(36) Felig, P. (1975) Annu. Rev. Biochem., 44:933-945

(37) Fisher, D. (1981) Biochem. J., 196:1-10

(38) Gaasbeek Janzen, J.W., Gebhardt, R., ten Voorde, G.H.J., Lamers, W.H., Charles, R, Moorman, A.F.M. (1987) J. Histochem. Cytochem., 35:49-54

(39) Gaasbeek Janzen, J.W., Lamers, W.H., Moorman, A.F.M., De Graaf, A., Los, J.A, Charles, R. (1984) J. Histochem. Cytochem., 32:557-564

(40) Gaasbeek Janzen, J.W., Moorman, A.F.M., Lamers, W.H., Charles, R. (1985) J. Histochem. Cytochem., 33:1205-1211

(41) Gazzola, G.C., Dall'Asta, V., Franchi-Gazzola, R., White, M.F. (1981) Anal. Biochem., 115:368-374

(42) Gazzola, G.C., Dall'Asta, V., Bussolati, O., Makowske, M, Christensen, H.N. (1981) J. Biol. Chem., 256:6054-6059

(43) Gazzola, G.C., Franchi, R., Saibene, V., Ronci, P, Guidotti, G.G. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 266:407-421

(44) Gebhardt,R. (1986) Habilitationsschrift, Universität Tübingen

(45) Gebhardt, R. (1980) Dissertation. Universität Tübingen

(46) Gebhardt, R., Burger, H.-J. (1987) J. Hepatology, 4:381-389

(47) Gebhardt, R., Burger, H.-J., Heini, H.G., Schreiber, K.L, Mecke, D. (1987) Hepatology, eingereicht

(48) Gebhardt, R., Cruise, J., Houck ,K.A., Luetteke, N.C., Novotny, A., Thaler, F. and, Michalopoulos, G.K. (1986) Differentiation, 33:45-55

(49) Gebhardt, R., Jung, W. (1982) J. Cell Sci., 56: 233-244

(50) Gebhardt, R., Kleemann, E., Mecke, D. (1987) Eur. J. Biochem., in press

(51) Gebhardt, R., Mecke, D. (1983) FEBS Lett., 161:275-278

(52) Gebhardt, R., Mecke, D. (1983) EMBO J., 2:567-570

(53) Gebhardt, R., Mecke, D. (1984) In: D. Häussinger, H. Sies, eds., Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues. Heidelberg: Springer-Verlag., 98-121

(54) Gebhardt, R., Mecke, D. (1984) In: Advances in Hepatic Encephalopathy and Urea Cycle Diseases. (Kleinberger, G., Ferenci, P., Riederer, P., Thaler, H., eds.). Karger, Basel, 126-131

(55) Gebhardt, R., Williams, G.M. (1986) Cell Biol. Toxicol., 2:9-20

(56) Gerok, W., Häussinger, D. (1984) in: Glutamine metabolism in Mammalian Tissues. (D. Häussinger and H. Siess, eds.), Springer Verlag, 257-277

(57) Groot de, C.J., ten Voorde, G.H.J., van Andel, R.E., te Kortschot, A., Gaasbeek Janzen, J.W., Wilson, R.H., Moorman, A.F.M., Charles, R, Lamers, W.H. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 908:231-240

(58) Guillouzo, A., Guguen-Guillouzo (eds.) (1986) Isolated and cultured heapatocytes. John Libbey Eurotext Ltd./INSERM, London, Paris.

(59) Gumucio, J.J., DeMason, L.J., Miller, D.L., Krezoski, S.O. Keener, M.. (1978) Am. J. Physiol., 234:C102-C109

(60) Gumucio, J.J., Katz, M.E. (1978) in Quantitative Aspects of structure and function (R. Pressig, J. Binder, eds.), Bern, 179-184

(61) Gumucio, J.J., May, M., Dvorak, C., Chianale, J, Massey, V. (1986) Hepatology, 6:932-944

(62) Gumucio, J.J., Miller, D.L. (1981) Gastroenterology, 80:393-403

(63) Gumucio, J.J., Miller, D.L., Kraus, M.D., Zanolli, C.C. (1981) Gastroenterology, 80:639-646

(64) Hallermeyer, K., Harmening, C., Hamprecht, B. (1981) J. Neurochem., 37:43-52

(65) Handlogten, M.E., Garcia-Canero, R., Lancaster, K.T., Christensen, H.N. (1981) J. Biol. Chem., 256:7905-7909

(66) Handlogten, M.E., Kilberg, M.S., Christensen, H.N. (1982) J. Biol. Chem., 257:345-348

(67) Hansen, J.N. (1976) Anal. Biochem., 76:45-52

(68) Hayes, M.R., McGivan, J.D. (1982) Biochem. J., 204:365-368

(69) Heini, H.G. (1987) Dissertation, Universität Tübingen

(70) Hems, R., Stubbs, M., Krebs, H.A. (1968) Biochem. J. 102:807-815

(71) Hixson, D.C., Allison, J.P. (1985) Cancer Res., 45:3750-3760

(72) Häussinger, D. (1983) Eur. J. Biochem., 133:269-275

(73) Häussinger, D. (1986) in: Advances in Enzyme Regulation (G. Weber, ed.), Pergamon Press, Oxford; Vol. 23:159-180

(74) Häussinger, D., Gerok, W. (1983) Eur. J. Biochem., 136:421-425

(75) Häussinger, D., Gerok, W. (1984) Chem. Biol. Interactions, 48:191-194

(76) Häussinger, D., Gerok, W., Sies, W. (1984) Trends Biochem. Sci., 9:300-302

(77) Häussinger, D., Gerok, W. in: Regulation of Hepatic Metabolism (R.G. Thurman, F.C. Kauffman , K. Jungermann, eds.) (1986) Plenum Press, New York and London., 253-291

(78) Häussinger, D., Gerok, W. (1984) Eur. J.Biochem., 143:491-497

(79) Häussinger, D., Sies, H., Gerok, W. (1985) J. Hepatol., 1:3-14

(80) Häussinger, D., Sies, H. (1979) Eur. J. Biochem., 101:179-184

(81) Häussinger, D., Soboll, S., Meijer, A.J., Tager, J.M, and Sies, H. (1985) Eur. J. Biochem., 152:597-603

(82) Häussinger, D., Stehle, T., Gerok, W. (1985) Hoppe-Seyler' s Z. Physiol. Chem., 366:27-536

(83) Ishikawa, E. (1975) Adv. Enzyme Regul., 14:117-136

(84) Jaenicke, L., and Berson, W. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358:883-889

(85) James, R., Desmond, P., Kupfer, A., Schenker, S, Branch, R.A. (1981) J. Pharmacol. Exp. Ther., 217:127-132

(86) Ji, S., Chance, B., Nishiki, K., Smith, T., Rich, T. (1979) Am. J. Physiol., 236:C144-C1556

(87) Ji, S., Lemasters, J.J., Christenson, V., Thurman, R.G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79:5415-5419

(88) Jones, A.L., Schmucker, D.L., Mooney, J.S., Adler, R.D, . Ockner, R.K. (1978) Anat. Rec., 192:277-288

(89) Joseph, S.K., Bradford, N.M., McGivan, J.D. (1978) Biochem. J., 176:827-836

(90) Jungermann, K. (1986) in: Regulation of hepatic metabolism. Intra- and intercellular compartmentation (R.G. Thurman, F.C. Kaufman, K. Jungermann, eds) Plenum Press New York, 445-469

(91) Jungermann, K., Katz, N. (1982) In: Metabolic compartmentation (H. Sies, ed.), Academic Press, New York;411-435

(92) Jungermann, K., Katz, N. (1982) Hepatology, 2:385-395

(93) Jungermann, K., Probst, I., Anderson, B., Wölfle, D. (1983) in: Isolation, Characterization, and use of hepatocytes. (R.A. Harris, N.W. Cornell, eds.) Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford, 125-130

(94) Jungermann, K., Sasse, D. (1978) Trends Biochem. Sci., 3:198-202

(95) Karcher, D., Lowenthal, A., Thormar, H., Noppe, M. (1981) J. Immunol. Meth., 43:175-179

(96) Katz, N., Teutsch, H.F., Jungermann, K., Sasse, D. (1976) FEBS Lett., 69:23-28

(97) Kauffman, F.C., Matschinsky, F.M. in: Regulation of Hepatic Metabolism (R.G. Thurman, F.C. Kauffman and K. Jungermann, eds.) (1986) Plenum Press New York and London

(98) Kearny, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewski, K. (1979) J. Immunol., 123:74-83

(99) Kelley, D.S., Potter, V.R. (1978) J. Biol. Chem., 253: 9009-9017

(100) Kessler, S.W. (1975) J. Immunology, 115:1617-1624

(101) Kiernan, F. (1833) Philos. Trans. R. Soc. London, 123: 711-770

(102) Kilberg, M.S. (1982) J. Membrane Biol., 69:1-12

(103) Kilberg, M.S., Barber, E.F., Handlogten, M.E. (1985) Curr. Top. Cell. Regul., 25:133-163

(104) Kilberg, M.S., Christensen, H.N., Handlogten, M.E. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., 88:744-751

(105) Kilberg, M.S., Handlogten, M.E., Christensen, H.N. (1980) J. Biol. Chem., 255:4011-4019

(106) Kilberg, M.S., Neuhaus, O.W. (1977) J. Supramol. Struct., 6:191-204

(107) Kleemann, E. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

(108) Kletzien, R.F., Parzia, M.W., Becker, J.E., Van Potter, R., Butcher, F.R. (1976) J. Biol. Chem., 256:3014-3020

(109) Klose, U. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

(110) Koch, M.R., Lea, M.A. (1981) Cancer Res., 41:3065-3070

(111) Koch-Weser, D., De la Huerga, J., Yesinick, D., Popper, H. (1953) Metabolism, 2:248-260

(112) Kohn, M.C., Menton, L.E., Garfinkel, D.A. (1979) Computers Biomed. Res., 12:461-469

(113) Kraemer, B.L., Staecker, J.L., Sawada, N., Sattler, G.L., Hsia, S.M.T, Pitot, H. (1986) In vitro, 22:201-211

(114) Krebs, H.A. (1935) Biochem J., 29:1951-1959

(115) Krebs, H.A. und Henseleit, K. (1932) Klin. W., 11:757-759

(116) Krebs, H.A. und Henseleit, K. (1932) Klin. W., 1:1137-1139

(117) LaAne, J.S., Schenken, J.R., Kuker, L.H. (1944) Am. J. Med. Sci., 208:223-224

(118) Laemmli, U.K. (1970) Nature, 227:680-683

(119) Lamers, W.H., Gaasbeek Janzen, J.W., Moorman, A.F.M., Charles, R. (1986) persönliche Mitteilung

(120) Le Cam, A., Freychet, P. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 72:893-900

(121) Le Rumeur, E., Guguen-Guillouzo, C., Beaumont, C., Saunier, A, Guillouzo, A. (1983) Exp. Cell Res., 147: 247-256

(122) Leffert, H.L., Koch, K.S., Moran, T., Rubalcava, B. (1979) Gastroenterology, 76:1470-1482

(123) Leif, R.C. in: Automated Cell Identification and Cell Sorting (G.L. Wied and G.F. Bahr, eds.) (1970) Academic Press, New York and London, 21-95

(124) Levintow, L. (1954) J. Natl. Cancer Inst., 15:347-352

(125) Lindros, K.O., Bengtsson, G., Salaspuro, M., Väänänen, H. in: Regulation of Hepatic Metabolism (R.G. Thurman, F.C. Kauffman, K. Jungermann, eds.) (1986) Plenum Press, New York and London, 137-158

(126) Lindros, K.O., Penttilä, K.E. (1985) Biochem. J., 228: 757-760

(127) Locher, M. (1987) Dissertation, Universität Tübingen

(128) Loud, A. (1968) J. Cell. Biol., 37:27-46

(129) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) J. Biol.Chem., 193:265-275

(130) Lund, P. (1980) FEBS Lett., 117:K86-K92

(131) Lund, P., Watford, M. (1976) in: The Urea Cycle. (S. Grisolia, R. Baguena and F.Mayor, eds.), Wiley, London, 478-488

(132) Lusty, C.J. (1978) Eur. J. Biochem., 85:373-383

(133) Makowske, M., Christensen, H.N. (1982) J. Biol. Chem., 257:5663-5670

(134) Metzler, H. (1982) Dissertation, Universität Tübingen

(135) Miller, S.B., Saccomani, G., Pretlow, T. P., Kimball, P.M., Scott, J.A., Sachs, G, Pretlow, T.G. (1983) Cancer Res., 43:4176-4179

(136) Mitzutani, A. (1968) J. Histochem. Cytochem., 16:172-180

(137) Nagamori, S., Fujise, K., Hasamura, S., Homma, S., Sujino H, Kameda, H. (1983) in: Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes. (R.A Harris and N.W. Cornell, eds.) Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford, 145-149

(138) Novikov, A.B. (1959) J. Histochem. Cytochem., 7:240-244

(139) Oberling, C., Rouiller, C. (1967) Ann. Anat. Pathol., 1:401-427

(140) Oxender, D.L., Christensen, H.N. (1963) J. Biol. Chem., 238:3686-3699

(141) Pariza, M.W., Kletzien, R.F., Butcher, F.R., Van Potter, R. (1976) Adv. Enzyme Regul., 14:103-115

(142) Pertoft, H., Rubin, K., Kjellen, L., Laurent, T, Klingeborn, B. (1977) Exp. Cell Res., 110:449-457

(143) Probst, I., Jungermann, K. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364:1739-1746

(144) Prusiner, S., & Milner, L. (1970) Anal. Biochem., 37:429-438

(145) Pösö, A.R., Penttilä, K.E., Suolinna, E.-M., Lindros, K.O. (1986) Biochem. J., 239:263-267

(146) Quistoff, B., Grunnet, N., Cornell, N. (1985) Biochem. J., 226:289-297

(147) Quistorff, B. (1985) Biochem. J., 229:221-226

(148) Quistorff, B., Dich, J., Grunnet, N. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun., 139:1055-1061

(149) Rappaport, A.M. (1976) Beitr. Path., 157:215-243

(150) Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Longheed, W.M., Lotto, W.N. (1954) Anat. Rec., 119:11-34

(151) Rees, R.K., Tarlowe, M.J. (1967) Biochem. J., 104:757-761

(152) Reid, W.D. (1972) Experientia, 28:1058-1061

(153) Reith, A., Schüler, B. (1971) J. Ultrastruct. Res., 36:550-551

(154) Remesy, C., Demigne, E., Aufrere, J. (1978) Biochem. J., 170:321-329

(155) Riggs, T.R., Pan, M.W. (1972) Biochem. J., 128:19-27

(156) Robenek, H. (1987) Eur. J. Cell Biol.,43:110-120

(157) Rojkind, M., Portales, M.L., Cid, M.E. (1974) FEBS Lett., 47:11-14

(158) Ronzio, R.A., Rowe, W.B., Wilk, S.., and Meister, A. (1969) Biochemistry, 8:2670-2676

(159) Rose, P.G. (1969) Br. Med. J., 1:361-362

(160) Rouiller, C. (1964) in: The Liver, Vol II (C.C. Rouiller, ed.), Academic Press, New York, 335-476

(161) Russo, E., Drochmans, P., Penasse, W., Wanson, J.C. (1975) J. Submicrosc. Cytol., 7:31-45

(162) Saheki, T., Yagi, Y., Sase, M., Nakano,K., Sato, E. (1983) Biomed. Res., 4:235-238

(163) Sasse, D. (1986) in: Regulation of hepatic metabolism. (R.G. Thurman, F.C. Kauffman and K. Jungermann,eds.), Plenum press, New York and London., 57-84

(164) Sasse, D., Katz, N., Jungermann, K. (1975) FEBS Lett., 57:83-88

(165) Schirmer, G. (1983) Dissertation, Universität Tübingen

(166) Schmucker, D.L., Mooney, J.S., Jones, A.L. (1978) J. Cell. Biol., 78:319-337

(167) Schäfer-Degenhart, I. (1986) Diplomarbeit, Universität Tübingen

(168) Seawright, A.A., Harklicker, J. (1972) Br. J. Exp. Pathol., 52:242-252

(169) Seglen, P.O. (1976) Methods Cell. Biol., 13:29-83

(170) Shotwell, M.A., Jayme, D.W., Kilberg, M.S., Oxender, D.L. (1981) J. Biol. Chem., 256:5422-5427

(171) Shotwell, M.A., Kilberg, M.S., Oxender, D.L. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 737:267-284

(172) Sies, H. (1978) Methods Enzymol., 52:48-59

(173) Sies, H., Häussinger, D. (1984) in: Glutamine metabolism in mammalian tissues. (D. Häussinger, H. Sies, eds,), Springer Verlag, Heidelberg, New York, 78-97

(174) Sips, H.J., DeGraaf, P.A., Van Dam, K. (1982) Eur. J. Biochem., 122:259-264

(175) Sips, H.J., Groen, A.K., and Tager, J.M. (1980) FEBS Lett. 119:271-274

(176) Sips, H.J., van Amelsvoort, M.M., and van Dam, K. (1980) Eur. J. Biochem., 105:217-224

(177) Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J., Meyer, H.G. (1970) J. Histochem. Cytochem., 18:315-333

(178) Summner, J.C., Freedman, R.B., Lodola, A. (1983) Eur. J. Biochem., 134:539-545

(179) Tate, S.S., Leu, F.-Y., Meister, A. (1972) J. Biol. Chem., 247:5312-5321

(180) Thorgeirsson, S.S., Mitchell, J.R., Sasame, H.A., Potter, W.Z. (1976) Chem. Biol. Interact., 15:139-147

(181) Thurman, R.G.., Kauffman, F.C., Jungermann, K. (eds.), Regulation of hepatic metabolism, Intra- and Intercellular Compartmentation (1986) Plenum Press, New York and London

(182) Thurman, R.G., Kaufman, F.C., and Baron, J. (1986) in :Regulation of Hepatic metabolism (R.G Thurman, F.C. Kaufman and K. Jungermann, eds), Plenum Press, New York and London, 321-382

(183) Tonda, K., Hasegawa, T., Hirata, M. (1983) Mol. Pharmacol., 23:235-243

(184) Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76:4350-4354

(185) Tulp, A., Welagen, J.J.M.N., Emmelot, P. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 451:567-582

(186) Ugele, B., Locher, M., Burger, H.-J., Gebhardt, R. (1987) In : Bile Acids and the Liver. (Paumgartner, G., Stiehl, A., Gerok, W., eds.), MTP press, Lancaster, in press

(187) Ui, M., Exton, J.H., Park, C.A. (1973) J. Biol. Chem., 218:5350-5359

(188) Vadgama, J.V., Christensen, H.N. (1983) J. Biol. Chem., 258:6422-6429

(189) Väänänen, H., Lindros, K.O., Salaspuro, M. (1983) Liver, 3:131-139

(190) Wanson, J.-C., Bernaert, D., Penasse, W., Mosselmans, R, Bannasch, P. (1980) Cancer Res., 40:459-471

(191) Wanson, J.C., Drochmans, P., May, C., Penasse, W, Popowski, A. (1975) J. Cell. Biol., 66:23-41

(192) Weigand, K., Otto, I., Schopf, R. (1974) Acta Hepato-Gastroenterol., 21:245-253

(193) Wells, J.R. in: Cell Separation (T.G. Pretlow and T.W. Pretlow, eds.) (1982) Academic Press, New York., 169-191

(194) Williams, G.M., Gunn, J.M. (1974) Exp. Cell. Res., 89: 139-142

(195) Willson, R.A., Hart, J.R. (1981) Gastroenterology, 81: 563-569

(196) Windmüller, H.G. (1984) in : Glutamine metabolism in Mammalian Tissues (D. Häussinger and H. Sies, eds.) Springer-Verlag, Heidelberg, 61-77

(197) Zapf, J., Froesch, E.R., Humbel, R.E. (1981) Curr. Top. Cell. Regul., 19:257-307

(198) Zimmermann, H.J. Hepatotoxicity, (1978) Appleton-Crofts, New York

6. Zusammenfassung

1. Die Glutaminsynthetase (GS) aus Rattenleber wurde durch Säurefällung und mittels verschiedener chromatographischer Verfahren aufgereinigt. Der Anreicherungsfaktor betrug 588.

2. Gegen das gereinigte Enzym wurde ein polyklonales Antiserum hergestellt, das über Glutaminsynthetase-freie Zellkulturen affinitätsgereinigt wurde. Die Monospezifität des Antiserum wurde durch Western-Blotanalyse nachgewiesen. Das hergestellte Antiserum war geeignet, Glutaminsynthetase in situ und in der Primärkultur nachzuweisen und konnte damit zur Markierung von perivenösen Zellen verwendet werden.

3. Durch Zentrifugation in einem hochauflösenden kontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten wurden isolierte vitale Hepatozyten in einer einzigen breiten Bande aufgetrennt. Zum Vergleich aufgetrennte perivenöse Hepatozyten zeigen die gleiche Dichteverteilung wie die Gesamtzellsuspension. Die Messung der Glutaminsynthetase-Aktivität zeigte, daß zwar in den Fraktionen mit den leichteren Zellen Glutaminsynthetase-positive Zellen angereichert werden konnten, deuten aber gleichzeitig auf eine geringe Selektivität dieser Trennmethode hin.
   Die Bestimmung der Aktivitäten der Glutamt-Pyruvat-Transaminase und der Pyruvatkinase als Markerenzyme zur Beurteilung der Trennung ist vor allem bei schwachen Anreicherungen nicht ausreichend.

4. In weiteren experimentellen Ansätzen wurde versucht, nach einer Vorbehandlung der Tiere mit leberschädigenden Substanzen, eine Anreicherung von Hepatozyten aus verschiedenen Zonen zu erreichen.

Durch Behandlung mit CCl_4 über einen Zeitraum von 3 Tagen konnten die ausschließlich perivenös lokalisierten GS-positiven Zellen fast vollständig zerstört werden. Aus den Lebern dieser Tiere konnten Hepatozyten aus Zone 1 und 2 isoliert werden, die sich hervorragend an die Bedingungen in der Primärkultur anpaßten und ein funktionelles Muster, charakteristisch für Zellen aus dieser Zone, aufwiesen. Charakteristisch für diese Kulturen war ein Ausfall der Dexamethason-Induktion des Glutamattransports über System G^-, während die hormonelle Induzierbarkeit von System A nicht beeinträchtigt war. Diese unterschiedliche Induzierbarkeit könnte eine Folge von Veränderungen in der hormonellen Antwort der Zellen während des Regenerationsprozesses sein.
Für Allylformiat konnten keine Bedingungen gefunden werden, die einerseits ein längeres Überleben der Tiere ermöglichten, und andererseits zu einer selektiven periportalen Schädigung führten. Vorbehandlung der Tiere mit einer Dosis (50 µl/kg) für 3 Tage bewirkte eine Abnahme der GPT-Aktivität führt aber auch zu einer Reduktion des GS-positiven Areals. Dies wurde durch Messungen der Enzymaktivität bestätigt.

5. Mit der Digitonin/Kollagenase-Technik konnten selektiv perivenöse und periportale Hepatozyten isoliert werden. Die GS fand sich fast ausschließlich in den mit perivenösen Zellen angereicherten Fraktionen. Die Anreicherung an GS-positiven Zellen war 2,5-3 fach gegenüber der Ausgangssuspension. Das Aktivitätsverhältnis perivenös:periportal betrug 56.

6. Die Verwendung von angereicherten perivenösen Hepatozyten erlaubte die Quantifizierung der Co-Lokalisierung von GS und Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS). In bis zu 50 % der GS-positiven Hepatozyten wurden beide Enzyme gleichzeitig exprimiert.

7. Mit den angereicherten perivenösen und periportalen Zellen konnte eine Heterogenität des Aminosäuretransports gezeigt werden. Der Natrium-unabhängige Transport von Histidin war in perivenösen Zellen deutlich höher, als in periportalen. Der Natrium-unabhängige Transport von Glutamat und von α-Aminoisobutyrat (AIB) zeigte hingegen keine Heterogenität. Der Natrium-abhängige Transport via System A und N zeigte keine Heterogenität, während der Transport über System G^- in perivenösen Hepatozyten deutlich erhöht war.
Diese Unterschiede blieben auch nach Kultivierung der Zellen bis zu zwei Tagen, sowohl im basalen als auch im hormonell induzierten Zustand erhalten. Außerdem war in der Kultur der Transport von AIB im induzierten Zustand in den perivenösen Zellen leicht höher.

8. Mit der Analyse der Konzentrationsabhängigkeit des Dexamethason-induzierten Natrium-abhängigen Transports von Glutamat in kultivierten Hepatozyten konnte gezeigt werden, daß an der Natrium-abhängigen Aufnahme nur eine Transportkomponente beteiligt war. Der Km-Wert wurde in normalen Zellen zu 80 µM und in perivenösen und periportalen Hepatozyten zu 66 bzw. 36 µM bestimmt.

9. Nach Anreicherung von Zytoplasmamembranfraktionen mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus in Gegenwart von Dexamethason kultivierten Hepatozyten wurden polyklonale Antiseren gegen diese Präparationen hergestellt. Adsorption an CCl_4-Kulturen lieferte keine Antikörper gegen zonal heterogene Antigene. Die Antiseren markierten überwiegend Antigene, die mit dem kanalikulären Teil der Plasmamembran assoziiert waren.

10. Es wurden monoklonale Antikörper hergestellt, die extrem verteilte periportale (BG8-B1) oder perivenöse Antigene (BG11-D6) erkennen. Der monoklonale Antikörper BG8-B1 färbte Hepatozyten direkt um die Portalfelder herum an (ca. 22% der Hepatozyten). Das von diesem Antikörper erkannte Antigen wurde in der Primärkultur innerhalb von 24 h von fast allen Hepatozyten exprimiert.

11. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen die außergewöhnliche Heterogenität des Leberparenchyms im Stoffwechsel von Glutamat und Glutamin. Die Befunde zur heterogenen Verteilung des Aminosäuretransports, die insbesondere eine hormonell regulierte Bereitstellung von Glutamat für die Glutaminsynthese und einen Austransport des synthetisierten Glutamins über eine Natrium-unabhängige Transportkomponente nahelegen, unterstützen das Konzept eines "interzellulären Glutaminzyklus". Die Co-Lokalisation der GS und der Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS), sowie das Verhalten des periportalen Markers BG8-B1 in der Kultur, liefern interessante Aspekte für die Suche nach den determinierenden Faktoren der wahrscheinlich grundsätzlich eigenständigen Heterogenität der GS.

12. Die Ergebnisse zur Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern gegen heterogen lokalisierte Antigene bilden die Grundlage für Versuche, die zur Gewinnung von Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigenen der GS-positiven Hepatozyten führen sollen und damit möglicherweise zur Isolierung von reinen, vitalen GS-positiven Hepatozyten.

Liste der Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolinsulfonat(6))
AIB	α-Aminoisobutyrat
BAC	Bis-acrylcystamin
BSA(RSA)	Rinderserumalbumin
CPS	Carbamoylphosphat-Synthetase
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMEM	Dulbeccos's Modifikation des MEM
DTT	DL-Dithiothreitol
Dex(D)	Dexamethason (9-Fluor-16-Methyl-Prednisolon)
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(ß-aminoethylether)tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Glutaminsynthetase
Glu	Glutamat
Gluc(G)	Glucagon
HEPES	N-2-Hydroxypiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IM	Isolationsmedium
Ins(I)	Insulin
MEM	Minimal Essential Medium
PAP-	Peroxidase-Antiperoxidase-
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PK	Pyruvatkinase
PM	Perfusionsmedium
PPM	Präperfusionsmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIP	Stock isoosmotic Percoll solution
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf:

Persönliche Daten

Geburtstag und -ort:	29. 05. 1956 in Stuttgart
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildungsdaten

Schulbildung:	1963-1966	Grundschule am Klostergarten in Sindelfingen
	1966-1969	Gymnasium in den Pfarrwiesen in Sindelfingen
	1969-1975	Stiftsgymnasium in Sindelfingen: Abitur
Berufsausbildung:	1976-1977	Studium der Chemie an der Universität Tübingen
	1977-1980 und 1982-1983	Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
	1980-1981	Studium der Chemie an der Universität in München (Einjähriger Studienaufenthalt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Müchen/Martinsried)
	Nov. 1982	Hauptdiplomprüfung
	März 1983- Dez. 1983	Diplomarbeit am Toxikologischen Institut der Universität in Tübingen bei Prof. Dr. H. Remmer Thema: Vitalität und Fremdstoffmetabolismus isolierter Nierenzellen vom Meerschweinchen; Vergleich mit isolierten Leber- und Darmzellen.
	Jan. 1984- Aug. 1987	Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke und Dr. R. Gebhardt am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität in Tübingen
Wehrdienst	1975-1976	Sanitätsdienst in Ulm/Dornstadt

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Anatomie:	W. Reutter
Anorganische Chemie	J. Strähle
Botanik:	H. Metzner
Medizinische Strahlenkunde:	U. Feine, E. Kallee
Mikrobiologie:	H. Zähner
Organische Chemie	E. Bayer, M. Hanack
Pharmakologie und Toxikologie:	H. Remmer
Physik:	G. Staudt
Physikalische Chemie:	H. Mauser
Physikalische Biochemie:	M. Klingenberg, D. Oesterhelt (München)
Physiologie:	E. Betz
Physiologische Chemie:	D. Mecke, G. Weitzel, H. Probst, J. Guglielmi
Theoretische Chemie:	F. F. Seelig
Zoologie:	K. G. Grell